

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**“LOS SENSORES DE OXÍGENO COMO DIANAS
TERAPEÚTICAS: ACTIVACIÓN FARMACOLÓGICA DE
LAS HIDROXILASAS DE HIF”**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA MADRID REGISTRO GENERAL
Entrada 01 Nº. 200400024043 23/11/04 10:51:58

Reg. F.M. 29.700

ELISA TEMES ZAFRILLA

MADRID, Noviembre de 2004



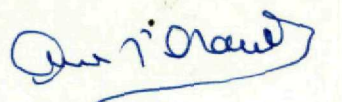
Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de Sobresaliente "cum laude" por unanimidad
Madrid, 21 de Enero 2005



J. L. Robb



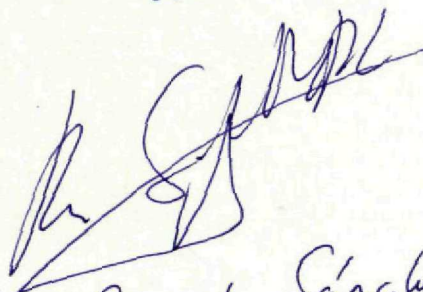
Luis del Real



ANA M. ARANDA



A Gilz



Ricardo Sánchez Prieto

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**“LOS SENSORES DE OXÍGENO COMO DIANAS
TERAPEÚTICAS: ACTIVACIÓN FARMACOLÓGICA DE
LAS HIDROXILASAS DE HIF”**

TESIS DOCTORAL presentada por:

ELISA TEMES ZAFRILLA,
Licenciada en Bioquímica y Biología,
para optar al grado de Doctor.

Director: **DR. MANUEL ORTIZ DE LANDÁZURI**
Catedrático de Inmunología. Departamento de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Tesis realizada en el Hospital Universitario de La Princesa,
Servicio de Inmunología. Universidad Autónoma de Madrid.

n / Address SERVICIO DE INMUNOLOGIA
Hospital de la Princesa
Diego de León, 62
28006 Madrid
Teléfono 915 202 307
Fax 915 202 374 / 913 092 496

D^a Elisa Temes Zafrilla ha desarrollado bajo mi dirección el trabajo titulado :
“Los sensores de oxígeno como dianas terapéuticas: activación farmacológica de las hidroxilasas de HIF”, realizado en el Servicio de Inmunología del Hospital de la Princesa de Madrid.

Por sus aportaciones e interés actual, este trabajo se estima merecedor de ser aceptado como TESIS DOCTORAL en la Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica, de la Universidad Autónoma de Madrid.

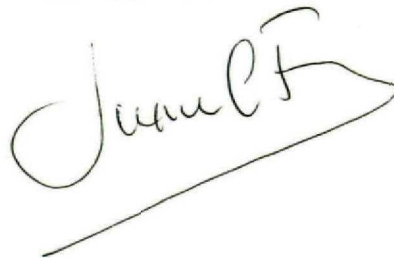
En Madrid, a 17 de noviembre de 2004

VºBº del Tutor



Dr. Manuel Ortiz de Landázuri

Catedrático de Inmunología de la U.A.M.



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primer lugar a Manuel Ortiz de Landázuri, el director de este trabajo, el haberme permitido el realizar este trabajo bajo su tutela. Gracias por su apoyo en todo momento y su preocupación por nuestra situación económica así como de nuestra formación, lo que me ha permitido ir a congresos internacionales y aprender y disfrutar de lo que se hace fuera de España.

Quisiera agradecer a Luis del Peso su apoyo siempre y su interés contagiante por toda lo que significa ciencia.

A todos mis compañeros, pasados y presentes, de los Paco's, del New lab y por supuesto de Hi-Tech. Por todo lo que he aprendido, por todo lo que me he reído y por todo lo que he sufrido junto a ellos. A Silvia y a Bárbara con las que he trabajado codo con codo con todo lo que ello conlleva de bueno y de no tan bueno. A Yolanda y Nuria, por sus conversaciones en la comida de lo divino y lo humano.

A JA por su ánimo y apoyo en el mundo personal y de la ciencia.

Y a lo mejor que me llevo de estos años en la Princesa, la amistad de la familia Litón-“Vara-Vega” al completo, de Pilarín, y en especial de Rayito y de Maika. Sin ellos no se si hubiera superado los momentos duros. Seguiremos hablando de libros, cine, política, nietos, jubilaciones....

A mi familia, empezando por mis abuelos y siguiendo por tios, primos y sobrinos. Sobre todo a mis hermanos, gracias por ser tan especiales. En especial gracias a Isa y a Trifón, por todo lo vivido y aprendido con ellos. Gracias a la familia “postiza” que me ha correspondido, por su cariño constante. A mis amigos, desde la guarde a Marta, Ce y a Elena (por supuesto a sus churumbeles que me han alegrado muchísimos momentos). A la Abita y a Palo, muchas gracias por vuestro apoyo en especial estos últimos años ¡qué habría hecho sin vosotras!. A los amigos “postizos”, por hacerme reir hasta no poder más. Gracias en especial a Fer, uno de los pocos de fuera de este mundo que entiende lo duro que es, por su apoyo. A Pedro Barquero por su apoyo espiritual incondicional y su cariño.

A “mis niños” de Pan Bendito, porque me devolvieron la confianza mí misma y me mostraron que servía para algo en un momento de gran desesperación.

Y por último, los más importantes y lo más breve porque sería imposible resumirlo todo. A mis padres, porque todo lo bueno que tengo y que soy, es porque ellos me lo han dado o lo he aprendido viéndoles. Y a Juan, por ser mi “Alegría de Vivir”

RESUMEN

En condiciones de baja presión de oxígeno, las células llevan a cabo un programa adaptativo dirigido por el factor de transcripción inducible en hipoxia HIF. Nuestro grupo ha observado que la hipoxia induce el aumento de los niveles intracelulares de ácido fosfatídico en paralelo a la acumulación del factor HIF, y que ambos son inhibidos de manera dramática tras el tratamiento con el inhibidor específico de diacilglicerol quinasa R59949. En este trabajo hemos estudiado el mecanismo de acción de este agente farmacológico y para ello hemos analizado su acción sobre los elementos conocidos de la ruta canónica de la hipoxia. Nuestros resultados demuestran que el efecto inhibitorio sobre la regulación de HIF se debe a que este agente es capaz de activar las hidroxilasas de HIF y favorecer por tanto la interacción VHL-HIF y la posterior degradación vía proteosoma. Diferentes evidencias experimentales nos llevan a estas conclusiones. En primer lugar la inhibición en la acumulación tanto de HIF-1 como de HIF-2 se produce sin afectar a los niveles de mRNAs. El efecto inhibitorio no se observa en células deficientes en la proteína VHL, indicando se requiere esta proteína para que el R59949 bloquee la acumulación de HIF. En ensayos de actividad prolina hidroxilasa observamos que es capaz de aumentar la actividad tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia (1%O₂). Ello implicaría una mayor hidroxilación de HIF y en consecuencia de unión a VHL. Nuestro trabajo también sugiere que la actividad asparaginil hidroxilasa FIH podía ser activada por este agente, dado que encontramos que la expresión de genes dependiente de HIF se anulaba en la presencia de R59949. Por lo tanto, el conjunto de nuestros datos indica que R59949 es el primer activador descrito para las hidroxilasas de HIF y esto resulta de gran interés dado que hasta el momento sólo han sido descritos inhibidores para estas enzimas. Dados los efectos de la expresión y activación de HIF en la progresión tumoral y resistencia de las células cancerígenas al tratamiento, la caracterización de nuevos inhibidores de HIF es de crítica importancia.

Under low oxygen conditions, cells develop an adaptative program governed by Hypoxia-inducible factor (HIF). We have previously reported that hypoxia induces the intracellular level of phosphatidic acid in parallel to HIF protein accumulation, and that both are dramatically inhibited after treatment with the specific DGK inhibitor R59949. In the present work we have studied the mechanism of action of this pharmacological agent and for this purpose we have analysed its action upon the canonical hypoxia pathway. Our results demonstrate that R59949 treatment is able to stimulate HIF-hydroxylases activities and therefore enhancing VHL-HIF interaction and subsequent degradation by the proteasome. Different evidences led us to these conclusions. First of all, R59949 inhibits HIF-1 and HIF-2 protein level accumulation without affecting their mRNAs. The inhibitory effect is not observed in VHL deficient cells, indicating that the presence of VHL is necessary for R59949 to block HIF accumulation. In addition, we found that R59949 was able to stimulate prolyl hydroxylase (PHD) activity at normoxic conditions as well as at hypoxia (1%O₂). These results would implicate a greater HIF hydroxylation and therefore, an enhanced VHL-HIF binding. Our work suggests that asparaginil hydroxylase FIH could also be activated by this agent as we found that HIF-dependent gene expression was abolished in the presence of R59949. Finally, taken together these results reveal R59949 as the first activator of HIF-hydroxylases. This is of particular interest since only inhibitors for these enzymes have been described so far. Considering the effects of HIF expression and activation on tumor progression and resistance to cancer treatment, the characterization of novel HIF-inhibitors is of critical importance.

ÍNDICE

- AGRADECIMIENTOS 2

- RESUMEN 5

- ABREVIATURAS10

- INTRODUCCIÓN13

1. LA HIPOXIA CELULAR14

2. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA
CELULAR A LA HIPOXIA.....15

 A) Canales iónicos

 B) Especies reactivas de oxígeno (ROS)

 C) Cascadas de quinasas

3. LA RUTA CANÓNICA DE LA HIPOXIA.....18

 3.1 HIDROXILASAS DE HIF:PHDS Y FIH

 3.2 EL GEN SUPRESOR DE TUMORES VHL

 3.3 EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN INDUCIBLE EN HIPOXIA, HIF

 A)Dominios estructurales

 B)Regulación de hif por hipoxia

 C)Regulación de hif independiente de hipoxia

 D)Genes regulados por HIF e implicaciones de HIF en procesos patológicos

4. PAPEL DE LOS FOSFOLÍPIDOS DE MEMBRANA EN LOS MECANISMOS
DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.....28

 DIACILGLICEROL

 ÁCIDO FOSFATÍDICO

 DIACILGLICEROL QUINASA

- OBJETIVOS.....31

- MATERIALES Y MÉTODOS.....33

 1. Cultivos celulares y condiciones de hipoxia.

 2. Western blot.

 3. Determinación de los niveles de RNA mensajero. Q-RT-PCR.

 4. Generación de plásmidos recombinantes.

 5. Trasfecciones transitorias y ensayos de actividad luciferasa.

 6. Medida de los niveles endógenos de PA.

 7. Coinmunoprecipitación de VHL-HIF.

Immunoprecipitación de VHL de células 786-O-WT10

Ensayo de unión VHL-HIF

8. Ensayo de actividad PHD: captura *in vitro* de VHL.

- RESULTADOS.....	39
1. Efecto de la inhibición farmacológica del PA inducido en hipoxia sobre la transcripción de las isoformas α de HIF y sobre la proteína VHL	
2. Caracterización del efecto de R59949 sobre la actividad de las prolina hidroxilasas.	
3. Caracterización de la inhibición farmacológica del PA inducido en hipoxia sobre la transcripción dependiente de HIF	
- DISCUSIÓN.....	57
- CONCLUSIONES.....	64
- BIBLIOGRAFÍA.....	66
- ANEXO I.....	81
- ANEXO II.....	

ABREVIATURAS

ARNT: *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*, Translocador nuclear del receptor para aril hidrocarburos

bHLH: *basic-helix-loop-helix*, básico, hélice-vuelta-hélice

CAD: *C-terminal Transactivation Domain*, Dominio C-terminal de Transactivación

CREB: *cyclic AMP Response Element-Binding protein*, Proteína de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico

DAG: *Diacylglycerol*, Diacilglicerol

DGK: *Diacylglycerol Kinase*, Diacilglicerol Kinasa

EPAS: *Endothelial PAS protein (HIF-2)*, Proteína PAS endotelial (HIF-2)

EPO: *Erythropoietin*, Eritropoyetina

ERK: *Extracellular signal regulated kinase*, Kinasa regulada por señales extracelulares

FIH: *Factor Inhibiting HIF-1*, Factor inhibidor de HIF-1

HIF: *Hypoxia-inducible factor*, Factor inducible por hipoxia

HMEC: *Human Microvasculature Endothelial Cells*, Células endoteliales humanas de microvasculatura

HRE: *Hypoxia-response element*, Elemento de respuesta a Hipoxia

HUVEC: *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, Células endoteliales de la vena de cordón umbilical

IGF: *Insulin-like Growth Factor*, Factor de crecimiento similar a la insulina

IGFB: *Insulin-like Growth Factor Binding Protein*, Proteína de unión a IGF

IL-1: *Interleukin-1*, Interleukina-1

JNK: *Jun NH₂-terminal kinase*, Kinasa de la región NH₂-terminal de Jun

MAPK: *Mitogen activated protein kinase*, Proteína kinasa activada por mitógenos

mTOR: *mammalian Target Of Rapamycin*, Diana en mamíferos de la rapamicina

NAD: *N-terminal Transactivation Domain*, Dominio N-terminal de Transactivación

NLS: *Nuclear localization signal*, Señal de localización nuclear

ODD: *Oxygen-dependent degradation domain*, Dominio de degradación dependiente de oxígeno

PA: *Phosphatidic Acid*, Ácido Fosfatídico

PAI-1: *Plasminogen-activator inhibitor-1*, Inhibidor del activador del plasminógeno

PA: *Phosphatidic Acid Phosphatase*, Fosfatasa de Ácido Fosfatídico

PC: *Phosphatidylcholine*, Fosfatidilcolina

PHD: *Prolyl hydroxylase domain containing protein*, Proteína que contiene un dominio prolina hidroxilasa

PI3K: *Phosphatidylinositol 3 kinase*, Fosfatidil inositol 3 kinasa

PKC: *Protein Kinase C*, Proteína Kinasa C

PLC: *Phospholipase C*, Fosfolipasa C

- PLD:** *Phospholipase D*, Fosfolipasa D
- PP-1:** *Protein phosphatase-1*, Proteína Fosfatasa 1
- ROS:** *Reactive oxygen species*, Especies reactivas de oxígeno
- SM:** *Sphingomyelin*, Esfingomielina
- SMS:** *Sphingomyelin Synthase*, Esfingomielina Sintasa
- TAD:** *Transactivation Domain*, Dominio de Transactivación
- TGFβ:** *Transforming Growth Factor β*, Factor de crecimiento de transformación β
- TLC:** *Thin Layer Chromatography*, Cromatografía en capa fina
- TNFα:** *Tumor Necrosis Factor α*, Factor de necrosis tumoral α
- VEGF:** *Vascular Endothelial Growth Factor*, Factor de crecimiento del endotelio vascular
- VSMC:** *Vascular Smooth Muscle Cells*, Células de músculo liso vascular

INTRODUCCIÓN

1. LA HIPOXIA CELULAR

La estabilidad de la biosfera requiere un delicado balance entre la producción de O_2 por las plantas y su utilización por los organismos, desde bacterias a los humanos. Durante los últimos billones de años, una gran parte del diseño de la evolución se ha centrado en el desarrollo de procesos metabólicos altamente regulados que exploran la versatilidad química de esta abundante y permeable molécula. Su habilidad para aceptar electrones permite al O_2 el participar en reacciones de oxidación-reducción necesarias para la combustión de los compuestos orgánicos y así obtener energía metabólica. Esto tiene lugar en la cadena respiratoria que se encuentra en la mitocondria y está conservada en todos los organismos eucariotas. Igualmente se han desarrollado importantes rutas para defender a los organismos y a sus células del daño producido por compuestos activados de oxígeno como los peróxidos, superóxidos y radicales hidroxilo. Por lo tanto, la homeostasis del oxígeno deber ser mantenida de manera muy precisa y son necesarios programas génicos que respondan apropiadamente a alteraciones en la tensión de O_2 intracelular de manera específica de tejido y del momento del desarrollo en que se encuentre el organismo.

Aunque las células son cultivadas en el laboratorio a una concentración de O_2 constante en el ambiente del 21%, que corresponde a una PO_2 de aproximadamente 150mmHg (torr) al nivel del mar, las células del cuerpo humano están expuestas a continuos cambios y concentraciones mucho menores, que van desde 16% (100 torr) en los alveolos pulmonares a menos del 6% (40 torr) en la mayoría del resto de los órganos del cuerpo. Cuando la disminución en el aporte de oxígeno afecta a todas la células de un organismo, la situación se denomina hipoxia sistémica y se caracteriza por la disminución de la cantidad de oxígeno en la sangre. Esto ocurre en lugares situados a gran altitud, donde la disponibilidad de O_2 a nivel atmosférico está disminuida, en situaciones de anemias o patologías asociadas a la hemoglobina, en las que está afectado el correcto transporte del oxígeno en la sangre, en enfermedades pulmonares crónicas, hemorragias, etc. En estos procesos se inducen genes encargados de optimizar la cantidad de O_2 que llega a los tejidos. Se favorece la producción de eritropoyetina (EPO), que promueve la maduración y proliferación de progenitores eritroides (Jelkmann, 1992); se regula la homeostasis del hierro (transferrina, ceruloplasmina), ya que es el factor más limitante en eritropoyesis (Wenger, 2002), y se aumentan los niveles de tirosina hidroxilasa, lo que conlleva un incremento de la síntesis de dopamina en las células glómicas y por lo tanto un aumento de la frecuencia respiratoria y cardíaca (Bunn and Poyton, 1996). Por otro lado, hay procesos en los cuales se genera una reducción localizada de los niveles de O_2 como el desarrollo embrionario, el interior de tumores sólidos en crecimiento, y en procesos de isquemia cerebral o infarto de miocardio. Estas situaciones dan lugar, si se producen en el

cerebro, a una regulación de la excitabilidad neuronal por la alteración de la conductividad de sus canales iónicos, y en el resto del organismo, al aumento en la expresión de genes (factor de crecimiento del endotelio vascular, VEGF (Semenza, 2000c), su receptor, Flt-1, la endotelina-1 (Bergers and Benjamin, 2003; Semenza, 2003) destinados a la formación de estructuras vasculares para restablecer el flujo sanguíneo en la zona, mediante procesos de angiogénesis y vasculogénesis. Por último en situaciones de hipoxia celular, la producción deficiente de ATP en la mitocondria es compensada por la inducción de la expresión de genes implicados en el catabolismo de la glucosa, tales como transportadores específicos y enzimas glicolíticas (Firth et al., 1994; Firth et al., 1995; Semenza et al., 1996).

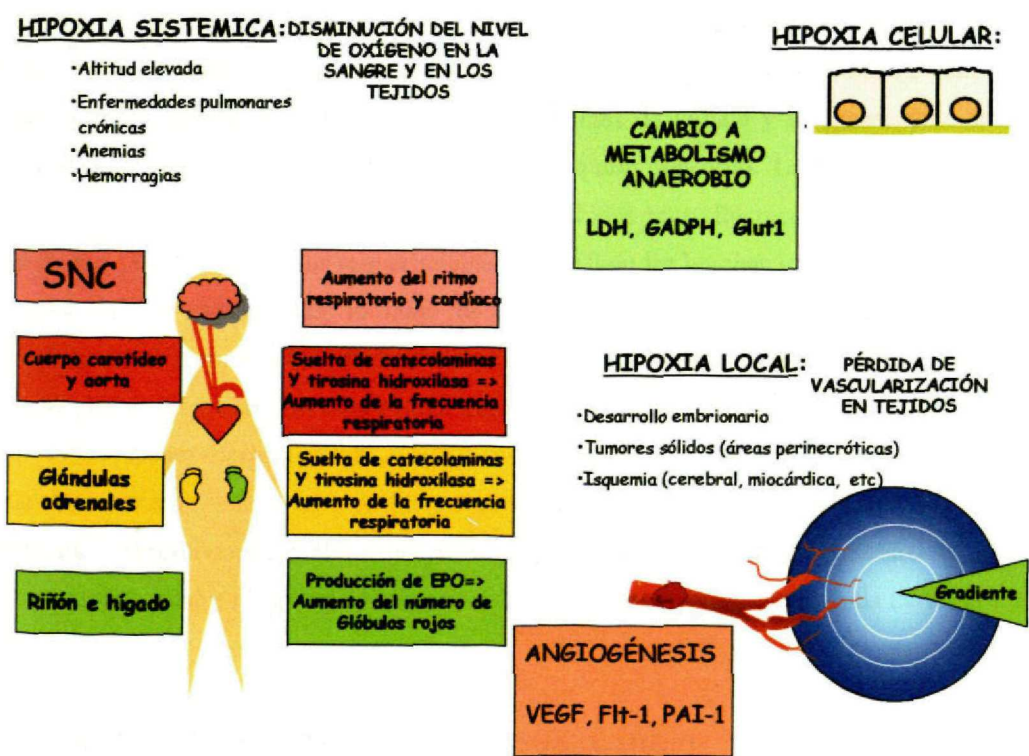


Figura1. Esquema de los procesos fisiopatológicos regulados por la hipoxia. Respuesta celular a la hipoxia sistémica y a la hipoxia local y celular.

2. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA CELULAR A LA HIPOXIA.

La presión de oxígeno parcial local representa el mayor regulador de la homeostasis del oxígeno, con mecanismos moleculares sensores de oxígeno a nivel celular. Estos sistemas se

han mantenido conservados evolutivamente y están presentes en la gran mayoría de tipos celulares estudiados. Son capaces de detectar un amplio rango de disminuciones en la tensión parcial (desde hipoxia moderada hasta anoxia). Esto es importante porque muchas respuestas adaptativas son anticipatorias para prevenir o retrasar la llegada de la hipoxia más severa.

El **factor de transcripción inducible en hipoxia (HIF)** es el factor central en toda la respuesta a hipoxia y muchos de las vías de transducción de señales que se ponen en marcha lo regulan de una u otra manera. Esto se detallará más adelante.

A) CANALES IÓNICOS

La respuesta más inmediata del organismo a la hipoxia es modulación de la actividad de una serie de canales iónicos en células excitables. La disminución en la tensión de oxígeno provoca instantáneamente la inhibición aguda y reversible de ciertos canales de potasio. La inhibición de las corrientes de potasio produce una despolarización de la membrana celular, lo que estimula la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje y la consecuente suelta de neurotransmisores que va a producir la descarga quimiosensorial. Las neuronas del sistema central tienen estos canales de potasio que son inhibidos reversiblemente por la hipoxia (Jiang and Hadad 1994), además, los requerimientos de ATP de las bombas iónicas disminuyen por el bloqueo de los canales. Por lo tanto la actividad neuronal y la excitabilidad se regulan directamente en respuesta a la disponibilidad de O_2 . También se encuentran estos canales en las células glómicas y cromafines del cuerpo carotídeo y (Bunn and Poyton, 1996; Lopez-Barneo et al., 1997; López-Barneo et al., 1999) en miocitos de las arteriolas pulmonares. La despolarización de estas células promueve un aumento de la ventilación y de la vasoconstricción pulmonar, respectivamente. Recientemente se ha descrito que la hemoxigenasa-2 es parte del complejo del canal y el sensor de oxígeno que modula la inhibición en hipoxia (Williams et al., 2004).

C) ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

La señalización por el estrés oxidativo se ha implicado en la iniciación de transcripción génica así como en otras respuestas adaptativas como el preconditionamiento isquémico en varios sistemas. Existe una gran controversia respecto a si la hipoxia promueve un aumento o una disminución de los ROS. Por una parte, se propone un modelo según el cual las enzimas generadoras de ROS, como el complejo del citocromo b558/NADPH oxidasa, actuarían como sensores celulares de oxígeno, disminuyendo la producción de ROS en hipoxia (Acker and Acker, 2004).

Por otro lado, el grupo de Schumacker ha descrito que la hipoxia en cardiomiocitos promueve el aumento de ROS (Duranteau et al., 1998). Según este modelo habría una generación de ROS a nivel del complejo del citocromo c mitocondrial en hipoxia. La cadena

mitocondrial es un sistema de alta afinidad que mantiene el flujo de electrones a través de la citocromo c oxidasa constante por debajo de un valor de PO_2 de 1 mmHg. Por lo tanto, el rango de tensiones cubierto por la sensibilidad de la mitocondria es pequeño. El aumento de ROS mitocondriales en hipoxia se ha descrito que induce la fosforilación de p38 en cardiomiocitos (Kulisz, 2002), así como el factor de transcripción CHOP-10 en adipocitos (Carrière, 2004).

En hipoxia se ha descrito la activación de factores de transcripción regulados por oxidación-reducción como NFkB, la hipoxia induce la expresión de IL-6 y COX-2 por activación de este factor en ciertos tipos celulares (Muraoka et al., 1997; Schmedtje et al., 1997). Además, se ha descrito un aumento de la expresión y unión al ADN de ciertos miembros de la familia AP-1 como c-Jun ó c-Fos (Ausserer et al., 1994) (Alfranca et al., 2002).

C) CASCADAS DE QUINASAS

La activación de distintas rutas de quinasas se ha descrito que tiene un papel en la regulación de genes por hipoxia, así como en la adaptación de la célula a esta situación.

La ruta de las MAP quinasas: ERK se activa por hipoxia en diversos tipos celulares, como en la línea de feocromocitoma PC12, en células HeLa, en la línea de microvasculatura endotelial humana HMEC-1 o en fibroblastos de arteria pulmonar (Conrad et al., 1999a; Conrad et al., 1999b; Minet et al., 2000; Muller et al., 1997; Scott et al., 1998). En fibroblastos vasculares su activación media el efecto proliferativo de la hipoxia mientras que en células HeLa la activación de ERK parece estar relacionada con la inducción transcripcional de c-fos. Su activación está asociada con el efecto cardioprotector del preconditionamiento hipóxico.

Por otro lado se han estudiado las **quinasas de estrés** como p38 y JNK. Ambas se activan por hipoxia, pero sólo en determinados tipos celulares (cardiomiocitos, modelos de isquemia cardíaca y cerebral o fibroblastos de arteria pulmonar) (Chihab et al., 1998; Laderoute et al., 1999; Scott et al., 1998; Seko et al., 1997; Yin et al., 1997), y en muchos casos sólo en situaciones de isquemia seguida de reperfusión. p38 se activa por hipoxia en PC12 e inhibe progresión en el ciclo celular, lo que puede ser un mecanismo adaptativo en células en división. Estas quinasas no se han relacionado directamente con la activación de HIF, salvo en un trabajo en el que se describe la fosforilación *in vitro* de HIF por p38 tras infección por el herpesvirus relacionado con el sarcoma de Kaposi (Sodhi et al., 2000).

Por último, la ruta de **PI3 quinasa** se activa por hipoxia en algunos tipos celulares como Hep3B ó PC12 (Hirota and Semenza, 2001). El mecanismo por el cual la hipoxia la activa es desconocido. Se ha descrito que puede jugar un papel en la supervivencia durante deprivación de suero junto con la hipoxia (Álvarez-Tejado et al., 2001). Asimismo, la ruta de PI3K parece ser la responsable de la inducción de ciertos genes dependientes de HIF asociados a la transformación de fibroblastos por el oncogen Ras, y operativa en células de glioblastoma deficientes en PTEN (Chen et al., 2001; Zundel et al., 2000).

Por otra parte se ha descrito que la hipoxia promueve la fosforilación de **CREB** en células PC12 por una kinasa desconocida, cooperando en el reclutamiento del coactivador p300/CBP (Beitner-Johnson and Millhorn, 1998; Ebert and Bunn, 1998).

3. LA RUTA CANÓNICA DE LA RESPUESTA A HIPOXIA:

HIF- HIDROXILASAS-VHL-HIF

La inducción del factor de transcripción inducible en hipoxia o HIF (hypoxia-inducible factor) es la respuesta mejor caracterizada y más universal ante situaciones de hipoxia (Huang and Bunn, 2003). El gran impacto de HIF en la biología de la célula se refleja en que el número de genes que se estima que se inducen por hipoxia es de un 1-2% de todos los genes humanos; alrededor de 70 se han identificado hasta ahora como dianas de HIF.

3.1 HIF-HIDROXILASAS

El descubrimiento de las HIF α prolin-4-hidroxilasas y la asparaginil hidroxilasa FIH (hidroxilasas de HIF) y su implicación en las regulación de la estabilización así como de la actividad transcripcional de HIF, ha permitido el establecer un consenso general en cuanto a la aceptación de las **PHDs** y **FIH** como los sensores celulares de oxígeno.

Las **hidroxilasas de HIF**, son dioxigenasas (incorporan los dos átomos del oxígeno molecular en sus productos) y pertenecen al gran grupo de enzimas que usan 2-oxoglutarato (intermediario del ciclo de Krebs) como co-sustrato, el hierro como metal activante y el ácido ascórbico como cofactor. Durante la catálisis, la ruptura del oxígeno molecular está acoplado a la hidroxilación del sustrato (HIF) y a la decarboxilación oxidativa del 2-oxoglutarato para dar succinato y CO₂. Un átomo de oxígeno se incorpora en el alcohol que resulta de la oxidación del primer sustrato y el otro es incorporado en el succinato. Las oxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato son la mayor familia de enzimas dependientes de Fe²⁺ sin contener un grupo hemo, que usan un motivo conservado de dos histidinas y un carboxilato (en el caso de las hidroxilasas de HIF un aspártico) para coordinar el hierro en el sitio catalítico. También conservan una arginina para la unión del 2-oxoglutarato. La unión del oxígeno al dominio catalítico requiere que el ascórbico mantenga al hierro en su estado ferroso (Schofield and Ratcliffe, 2004).

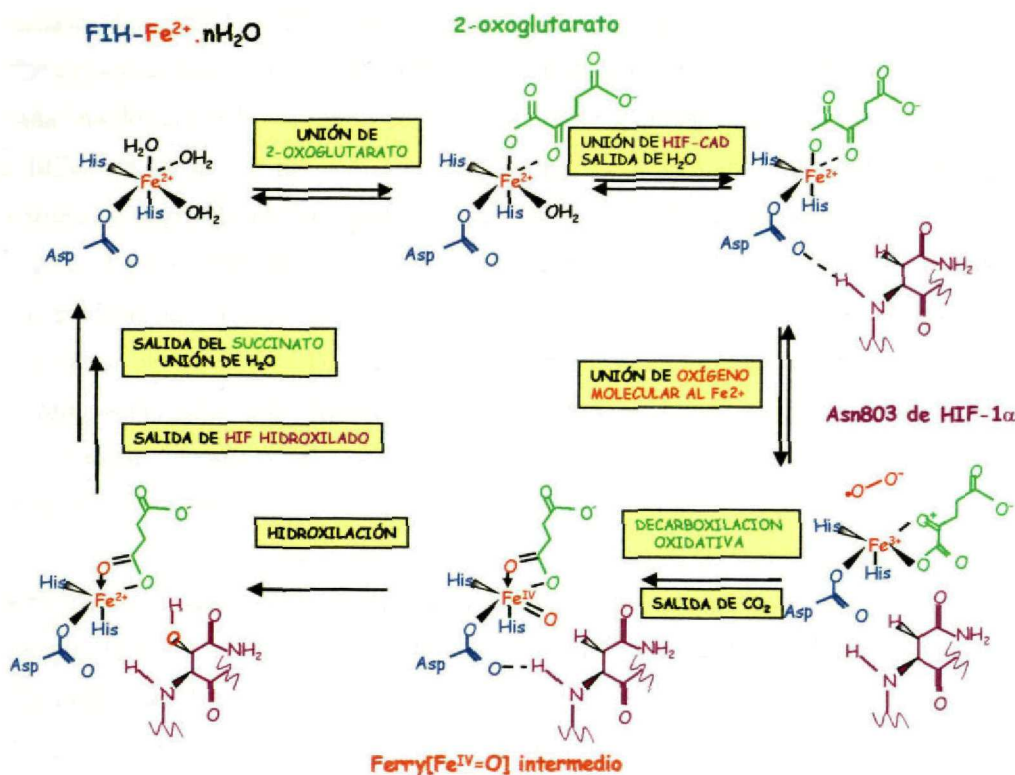


Figura 2. Mecanismo de acción de FIH sobre la asparagina 803 de HIF.

En condiciones de privación de oxígeno o de competición por análogos del sustrato, las hidroxilasas de HIF permanecen inactivas. Los mismos efectos se obtienen con quelantes de hierro, o cambio del hierro en el sitio activo por metales de transición. Son muy sensibles también a alteraciones en las concentraciones de cofactores y de concentración de sustrato (Wiener 1996 y Zhong 1999). Consistente con esta hipótesis, las concentraciones fisiológicas de ascorbato ($25\text{-}50\text{ }\mu\text{M}$) están por debajo del valor la K_m de las PHDs para él ($140\text{-}170\mu\text{M}$), sugiriendo que se pueden producir alteraciones significativas en la actividad PHD por cambios en las concentraciones de ácido ascórbico en la célula.

En mamíferos se han clonado tres isoformas diferentes de prolil hidroxilasas, que se han denominado PHDs por "prolyl hydroxylase domain containing" y que presentan una alta homología con las correspondientes enzimas de otras especies (Egl9 en *C.elegans* y SM-20 en rata) (Bruick and McKnight, 2001; Epstein et al., 2001). Las tres isoformas tienen una localización subcelular diferente, siendo la PHD1 predominantemente nuclear, frente al patrón citosólico que presentan tanto la PHD2 como la PHD3 (Huang et al., 2002; Metzen et al., 2003a). Aunque ubiquas, las PHDs difieren en la abundancia relativa de sus mRNA. Recientemente ha sido descrito que la hipoxia produce un incremento en los niveles del ARN

mensajero de la PHD2 y PHD3 en diversos tipos celulares (del Peso et al. 2003; Berra et al., 2003; Epstein et al., 2001). Estudios realizados mediante el uso de RNA de interferencia frente a cada una de las PHDs sugieren que PHD2 es la principal responsable de controlar los niveles de HIF-1 en normoxia al menos en condiciones de cultivo celular. Otros investigadores proponen el papel de PHD3 regulando los niveles de HIF-1 α tras una exposición de largo tiempo en hipoxia (5-6 días), Asimismo, la afinidad relativa de las distintas PHDs por cada una de las prolinas de HIF así como una posible regulación diferencial de cada una de las isoformas, están siendo objeto de estudio. Todos esto sugiere funciones no redundantes para cada PHD en distintas condiciones fisiológicas o patofisiológicas pero hasta el desarrollo de animales deficientes en cada una de ellas no se podrá determinar con exactitud. Poco se sabe a cerca de su implicación en patologías como neoplasias.

Un cuarto miembro de la familia de las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y hierro que interviene en la regulación de HIF es la asparagina hidroxilasa FIH (de “factor inhibiting HIF”) (Hewitson et al., 2002; Lando et al., 2002a). La hidroxilación de la asparagina 803 en HIF-1 α y la asparagina 851 en HIF-2 α regula la actividad transcripcional del factor (se explicará en detalle más adelante) (Lando et al., 2002b). FIH no presenta el residuo conservado de arginina/lisina que tienen otras dioxigenasas para unión del 2-oxoglutarato, incluidas las tres PHDs, lo que sugiere que pertenece a otra subfamilia de las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato. Además, no se ha definido un consenso para la hidroxilación de asparagina aunque la secuencia alrededor de ella está muy conservada entre especies. Los niveles de esta enzima presente en la célula son independientes de la concentración de oxígeno, su localización es ubicua y se encuentra en el citoplasma mayoritariamente.

Se han realizado ensayos de hidroxilación de HIF por extractos celulares y PHDs recombinantes, en condiciones controladas de concentración de oxígeno. Aunque es una medida en condiciones *in vitro*, la Km aparente para cada una de las PHDs se ha calculado en el rango de 230-250 μ M. La constante de afinidad de estas enzimas para el O₂ es muy alta en relación con los rangos de tensión de oxígeno fisiológicos en tejidos, lo que implica que trabajan en condiciones de no equilibrio, presentado una alta sensibilidad a los cambios del oxígeno. Pequeños cambios en la concentración de oxígeno resultan en cambios pronunciados en la velocidad de reacción y por lo tanto en la degradación de HIF. Cumplen así los requisitos para actuar como sensores de oxígeno Este resultado contrasta con la actividad procolaggeno-prolil hidroxilasa que tiene una Km de 40 μ M, lo que permite la síntesis de colágeno incluso a las condiciones fisiológicas de O₂ más bajas, como las que se dan en las articulaciones. La Km para la asparagínil hidroxilasa FIH es de 90 μ M.

3.2 EL GEN SUPRESOR DE TUMORES VHL.

La proteína VHL forma parte de un complejo E3 ubiquitín ligasa que contiene elonguina B, elonguina C, Cul2 y Rbx1 (Kaelin, 2002). Este complejo une de manera covalente colas de ubiquitina a las subunidades α de HIF en presencia de oxígeno, lo que sirve de señal para que sean degradadas por el proteosoma. VHL contiene dos dominios, el α es con el que se une a las elonguinas y a Cul2 y el β , con el que interacciona directamente con el ODD de las subunidades α de HIF (Ohh, 2000; Kamura, 2000). VHL es una proteína ubicua y que se encuentra en varios compartimentos. A parte de HIF, VHL se une a otras proteínas algunas de las cuales pueden ser dianas de poliubiquitinización, como miembros de la familia de PKC atípicas (Okuda et al., 2001), y subunidades específicas de la RNA polimerasa II (Kuznetsova et al., 2003).

Clínicamente el síndrome de von Hippel-Lindau es una enfermedad hereditaria heterocigótica autosómica dominante que se caracteriza por el desarrollo de múltiples tumores vasculares llamados hemangiomas en el sistema nervioso central y la retina, así como un incremento en el riesgo de cáncer de células claras del riñón y de feocromocitomas (Safran and Kaelin, 2003). El desarrollo de tumores está asociado a la pérdida somática del alelo conservado. Los tumores deficientes en VHL presentan HIF estabilizado constitutivamente y por tanto sobreexpresan genes dependientes de HIF. En células de carcinoma renal la re-expresión de VHL es necesaria y suficiente para la destrucción de HIF- α en presencia de oxígeno, pero es plausible que en otras células haya redundancia con otros complejos E3 ubiquitín ligasa (Kaelin, 2002).

3.3 EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN INDUCIBLE EN HIPOXIA, HIF.

A) DOMINIOS ESTRUCTURALES Y MIEMBROS DE LA FAMILIA HIF

El factor de transcripción HIF es un heterodímero formado por las subunidades α y β que pertenecen a la familia de factores de transcripción bHLH PAS, ya que presentan un dominio conservado tipo bHLH y otro dominio PAS también mantenido evolutivamente (de alta homología con los factores *Per*, *ARNT*, *Sim*) (Wang et al., 1995a). Los heterodímeros $\alpha\beta$ unen a un dominio de DNA denominado HRE (hypoxia responsible element) que se encuentra en un amplio número de promotores. La subunidad β , también conocida como ARNT, se expresa de manera constitutiva en el núcleo (Huang 1996). En las subunidades α es donde recae la regulación de la proteína. Existen tres tipos de subunidades α , codificadas por genes diferentes (Wenger, 2002), HIF-1 α , HIF-2 α o EPAS-1 y HIF-3 α (Gu et al., 1998). Se han descrito homólogos en especies tan alejadas en la escala evolutiva como *Drosophila* y *C.elegans*. HIF- α y HIF-2 α comparten un 48% de homología de secuencia y presentan muchas similitudes de

estructura y funcionales. Los mecanismos de regulación de estas dos subunidades son similares (ver más adelante), sin embargo, no existe un fenómeno de redundancia génica, ya que los embriones deficientes para ambos factores son letales y no llegan a término (Iyer et al., 1998; Kitch et al., 1999; Ryan et al., 1998). Las características funcionales y de regulación de HIF-3 α de momento son poco conocidas.

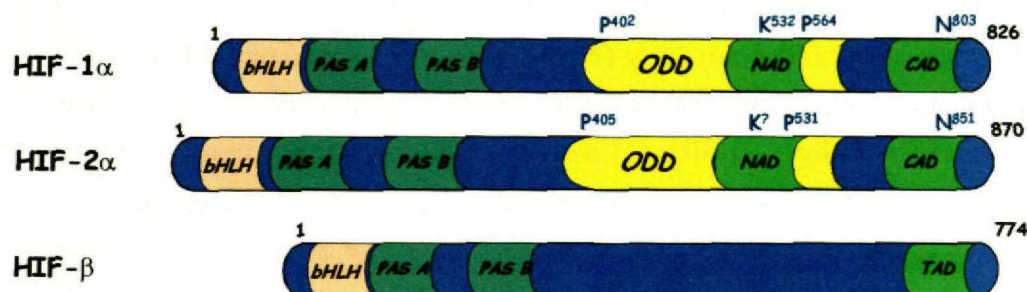


Figura 3. Estructura de las subunidades de HIF.

Los dominios bHLH PAS se encuentran en la zona N-terminal, estos dominios están implicados en la unión al ADN a través de residuos básicos, así como en la heterodimerización entre miembros de esta familia (Jiang et al., 1996a). En la mitad más C-terminal del factor existen dominios implicados en la transactivación y en la degradación, uno en posición N-terminal (NAD) localizado entre los residuos 531-575 de HIF-1 α y otro en posición C-terminal (CAD) entre los aminoácidos 786-826, entre ellos se encuentra el dominio y un dominio único de degradación dependiente de oxígeno (ODD), 401-603 (Huang et al., 1998).

B) REGULACIÓN DE HIF POR HIPOXIA

La expresión de los genes de las subunidades α y β y la estabilidad de sus RNA mensajeros, no se ven afectados por el porcentaje de oxígeno disponible. Sin embargo, la estabilización y la actividad de las subunidades α se regulan estrechamente según los niveles de oxígeno en el ambiente.

Degradación de HIF- α

Las subunidades α de HIF son proteínas muy inestables en condiciones de normoxia, con una vida media de 5 minutos, dado que sufren una rápida degradación por la vía del proteosoma, mientras que su estabilización se incrementa fuertemente en situaciones de hipoxia (Huang et al., 1996). En normoxia las subunidades α de HIF interactúan a nivel del dominio ODD con la proteína VHL, componente de reconocimiento del complejo E3 ubiquitín ligasa

responsable de la poliubiquitinización y posterior degradación dependiente del proteosoma de las subunidades α de HIF (Huang et al., 2002; Maxwell et al., 1999). Esta degradación puede tener lugar tanto en el núcleo como en el citoplasma (Berra et al., 2001). VHL reconoce las subunidades α de HIF a través de dos sitios independientes que contienen el motivo común **LXXLAP**, presentes tanto en HIF-1 α como en HIF-2 α (Huang et al., 2002). Para que tenga lugar la interacción entre VHL y los factores HIFs se requiere la hidroxilación de un residuo específico de prolina dentro de esta secuencia (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Las prolinas hidroxiladas corresponden a las posiciones 564 y 402 para HIF-1 y en posición 531 y 405 para HIF-2. La introducción del átomo de oxígeno en la prolina en posición 4, media la formación de dos puentes de hidrógeno con VHL (Ser 111 y His 115) suficientes para permitir la discriminación entre HIF hidroxilado y no hidroxilado. La hidroxilación de estas prolinas de HIF se ha atribuido a las PHDs. En hipoxia decae la actividad prolina hidroxilasa, de forma que desaparece la interacción entre pVHL y las subunidades α de HIF y se produce un fuerte aumento en los niveles de su proteína. Se acumula HIF-1 α y se transloca al núcleo gracias a la existencia de dos secuencias de localización nuclear (NLS) (Kallio et al., 1998). Una vez en el núcleo, la subunidad α interacciona con ARNT y se forman los heterodímeros α/β .

Activación Transcripcional de HIF

La activación transcripcional es otro paso clave implicado en la regulación de la actividad de HIF (Huang et al., 1998). Dentro de la región C-terminal de HIF existen dos dominios de transactivación. El CAD está altamente conservado, es estable *per se*, pero su actividad transcripcional se induce por hipoxia. El aumento de la actividad del CAD en estas condiciones se ha atribuido a la unión del coactivador p300/CBP por su dominio CH1 a esta zona C-terminal de la subunidad α . p300 y CBP son proteínas homólogas y expresadas ubiquamente, tiene actividad histona acetiltransferasa y son reclutadas por muchos factores de transcripción. Funcionan con coactivadores ya la acetilación de histonas modula la estructura de la cromatina, facilitando el acceso de los factores de transcripción a un determinado locus génico para aumentar la actividad transcripcional. Esta unión p300/HIF está regulada por la hidroxilación de un residuo de asparagina en posición 803 de HIF-1 α y 851 de HIF-2 α (Lando et al., 2002b). Esta hidroxilación está catalizada por FIH (Hewitson et al., 2002; Lando et al., 2002a). Así, en normoxia la asparagina 803 hidroxilada impide la unión de p300/CBP al CAD de HIF-1 α , en hipoxia se inhibe FIH por la ausencia de oxígeno, con lo que se potencia la unión de p300/CBP a la región C-terminal y se aumenta la expresión génica de genes diana de HIF. Esto permite un segundo paso de regulación de HIF, ya que moléculas que escaparan de la regulación por las PHDs, serían inactivas transcripcionalmente por la acción de FIH.

Las células no sólo perciben cambios radicales en la concentración de oxígeno, sino también cambios más sutiles. Las PHDs y FIH han sido caracterizados como los sensores de oxígeno aunque no tengan las mismas Km para el O₂ y para los análogos del 2-oxoglutarato. La Km de FIH para el oxígeno y el 2-oxoglutarato son sistemáticamente menores que las de las HIF prolyl-4-hydroxylasas. Esto sugiere que el estrés nutricional e hipóxico (cambios en la disponibilidad de O₂ y/o glucosa) afectaría primero a las actividades de las PHDs y se requeriría un descenso mayor para disminuir la actividad FIH. Por lo tanto, en respuesta a una bajada menor en la concentración de O₂, los niveles de HIF-1 α aumentarían pero manteniendo inhibición de la transcripción por FIH. Un mayor disminución en la concentración de O₂ se requeriría para reducir la actividad de FIH y permitir una máxima unión de p300 y una máxima estimulación de la actividad de HIF.

Acetilación de HIF por ARD-1

La proteína ARD1 (arrest-defective 1) es un miembro de la gran y diversa superfamilia de las acetiltransferasas, que incluye las acetiltransferasas de histonas. La acetilación de HIF-1 se ha propuesto como una modificación postraducciona importante en la estabilización de HIF (Jeong et al., 2002). La acetilación por ARD1 en la lisina 532 del dominio ODD, parece favorecer el reclutamiento de pVHL y así la degradación de HIF por el proteosoma. Por lo tanto ARD1 sería un regulador negativo de HIF y lo haría menos estable. La actividad N-acetiltransferasa no se conoce que sea modificada por el O₂, así que esta modificación ocurriría tanto en hipoxia como en normoxia. Sin embargo sí que se ha descrito una bajada de los niveles de ARD1 mRNA en hipoxia o en presencia de cloruro de cobalto, con lo que el nivel de acetilación de HIF-1 disminuiría tras la exposición a la hipoxia. ARD1 es una proteína citosólica, luego esta modificación ocurriría en el citosol.

C) REGULACIÓN DE HIF INDEPENDIENTE DE OXÍGENO

Además de la regulación de HIF-1 por hipoxia, se han descrito otra serie de estímulos capaces de inducir dicho factor. Los múltiples puntos de control que regulan HIF pueden depender del ambiente celular en un momento en particular dentro de diferentes situaciones fisiológicas o patológicas. La existencia de HIF-1 en tejidos normóxicos sugiere que se pueda requerir la presencia de HIF para mantener la expresión basal de genes esenciales. Así, se han descrito diferentes rutas de modulación de HIF:

Metales de transición

Se describe que células expuestas a metales de transición como el cobalto, el níquel y el zinc (Masson and Ratcliffe, 2003; Safran and Kaelin, 2003; Zhu and Bunn, 2001) estabilizan HIF en condiciones de normoxia así como el aumento de su actividad transcripcional y por lo

tanto la expresión de sus genes diana. Tanto el níquel como el cobalto o el zinc sustituyen al ión férrico, cofactor de las PHDs, en el centro activo del enzima, inhibiendo por tanto su actividad enzimática. Recientemente se ha descrito que el tratamiento de las células con níquel o cobalto bloquea la entrada a la célula de ácido ascórbico, co-factor de las PHDs. En ausencia de ascórbico el FeIII no puede ser reducido a FeII tras la reacción de hidroxilación y por lo tanto las PHDs permanecen inactivas (Salnikow et al., 2004).

Especies reactivas de Oxígeno.

Se ha demostrado que algunas citoquinas y factores de crecimiento generadores de ROS como el TNF- α , PDGF, angiotensina II (Sandau et al., 2001b) (Zelzer et al., 1998) (Richard et al., 2000; Semenza, 2002) aumentan los niveles de HIF y de sus genes diana, pero no está muy claro cómo. En este sentido se ha descrito recientemente (Gerald et al., 2004) que la acumulación de H₂O₂ en células junD -/- disminuye la disponibilidad de FeII debido a la reacción de Fenton y por lo tanto reduce la actividad de las PHDs y aumenta los niveles de HIF. De esta manera, regulando las PHDS, podrían estar actuando sobre HIF los ROS procedentes de otras fuentes, incluso los generados durante la hipoxia.

Factores de crecimiento.

HIF también aumenta en respuesta a estímulos entre los que se encuentran ciertos factores de crecimiento (EGF; FGF2, PDGF, HGF) (Richard et al., 2000; Semenza, 2002), así como múltiples citoquinas u hormonas (TNF α , IL-1 β , insulina, IGF-1,2, angiotensinaII, trombina, TGF- β 1, suero) (Sandau et al., 2001b) (Richard et al., 2000) (Gorlach et al., 2001) (Zelzer et al., 1998) (Jung et al., 2003a; Jung et al., 2003b; Zhou et al., 2003). Sin embargo, la expresión de HIF en respuesta a estos estímulos está limitada a ciertos tipos celulares muy específicos, sobre todo relacionados con un contexto endotelial o vascular (HUVEC, H-MEC, VSMC, etc...). La mayoría de estos estímulos induce la ruta de PI3Kinasa/AKT/mTOR así como la cascada de MAP Kinasas. Se ha descrito que la fosforilación de HIF-1 α por diferentes miembros de la familia de las MAPK tiene un efecto positivo sobre su actividad transcripcional (Salceda et al., 1997; Wang et al., 1995b). Sin embargo, los sitios de fosforilación por estas rutas no han sido caracterizados y pueden representar un mecanismo de regulación de HIF restringido a determinados tipos celulares o estímulos específicos.

Si la estimulación con estos factores tiene o no algún efecto sobre la actividad PHD se desconoce por el momento, aunque previamente se ha descrito la regulación de ciertas PHDs por varios estímulos como NGF o estrógenos en determinados tipos celulares (Lipscomb et al., 2001; Seth et al., 2002).

Oncogenes

En el seno de muchos tumores sólidos se induce la expresión de HIF, no sólo microambiente hipóxico que existe en la mayoría de tumores, sino también por diversas

alteraciones génicas como la pérdida de función de ciertos genes supresores de tumores, como *vhl*, *p53* ó *pten*, así como a la activación de ciertos oncogenes, como *v-ras* o *c-src*, (Semenza, 2000a; Semenza, 2000b). Asimismo, se ha descrito que la transformación oncogénica con *H-ras* aumenta los niveles de HIF a través de la ruta de PI3K (Chen et al., 2000; Mazure et al., 1997). La expresión del oncogen *v-src* aumenta los niveles de proteína por un mecanismo que implica aumento del ARN mensajero de HIF-1 α (Jiang et al., 1997). El oncogen *c-myc* actuaría directamente sobre ciertos elementos de respuesta a hipoxia (HRE), promoviendo su transcripción (Shim et al., 1997). También, se ha descrito para *ras* así como para *v-src* un mecanismo alternativo de estabilización de HIF que implica la inhibición de las PHDs (Chan et al., 2002). Por último, se ha observado un aumento de la síntesis de diversos factores de crecimiento y citokinas, así como de sus correspondientes receptores, en diversos tipos de células tumorales (Maxwell et al., 2001). Estos factores actuarían positivamente sobre HIF a través de las rutas indicadas anteriormente. (Semenza, 2001a). El gen supresor de tumores, *p53*, se ha implicado en la elevada expresión de HIF-1 α en tumores, de modo que los tumores negativos para *p53* (-/-) presentan niveles de HIF superiores a los de tumores *p53* positivos (+/+) (Ravi et al., 2000). En este contexto, *p53* promueve la ubiquitinización de HIF-1 α a través de MDM2, otra E3 ubiquitín ligasa.

D) GENES REGULADOS POR HIF

HIF es el principal regulador de la respuesta génica a la hipoxia. Los genes diana de HIF codifican para proteínas que desarrollan un papel crítico en diversos procesos fisiopatológicos. HIF regula positivamente la expresión de genes implicados en el metabolismo de la glucosa (transportador de glucosa *glut-1*, o diversas enzimas glicolíticas, como la *lactato deshidrogenasa*), asegurando así la generación de ATP en hipoxia de manera independiente de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Aunque muchos de los genes regulados positivamente por HIF promueven proliferación celular (IGF-2, IGFB 1,2 y 3), si se produce algún fallo que impida la correcta adaptación a hipoxia, puede tener lugar un proceso de muerte celular por apoptosis. De hecho, HIF-1 se ha implicado en la promoción de apoptosis en condiciones de hipoxia crónica (Carmeliet et al., 1998) y el gen promotor de apoptosis *nip3* se induce por HIF-1 (Tabla I). Otro de los procesos regulados por HIF es el transporte de hierro a los eritrocitos, se aumenta tanto la expresión de transferrina como de su transportador. También se induce la ceruloplasmina, que es una ferroxidasa requerida para oxidar el hierro de manera que pueda ser transportado por la transferrina. El sistema vascular está muy finamente regulado por O₂. VEGFs el principal gen diana de HIF implicado en el sistema vascular, es el mitógeno de endotelio más potente. HIF también parece regular a Flt1, uno de los receptores para VEGF. El aumento de la angiogénesis da lugar a un aumento de la densidad vascular y por lo tanto a una

Eritropoyesis	Eritropoyetina
Transporte	Transferrina, receptor de transferrina, ceruloplasmina,
Migración celular	Receptor de quimioquinas CXCR4, c-Met
Metabolismo energético	Glut 1 y 3, Hexokinasa 2, 6-fosfofructo-1-quinasa L, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa Aldolasa A, enolasa-1, fosfoglicerato quinasa-1, lactato deshidrogenasa, 6-fosfofructoquinasa-2, piruvato quinasa M,
Otros metabolismos	Anhidrasa carbónica 9, adenilato kinasa 3, prolil-4-hidroxilasa $\alpha 1$
Proliferación y apoptosis	Nip3, IGF-binding protein 1,2,3, ciclina G2, Endogлина,
Regulación de la transcripción	DEC1 y 2, ETS1, p35srj
Regulación tono vasomotor	A1B receptor adrenérgico, adrenomedulina, endotelina-1, tirosina hidroxilasa, Hemo oxigenasa 1, sintasa de NO inducible, Péptido atrial natriurético,
Angiogénesis	VEGF, FLT-1, TGF β 3, inhibidor del activador del plasminógeno

Figura4. Genes regulados por HIF

disminución en la distancia de difusión del oxígeno. El flujo sanguíneo local bajo situaciones patofisiológicas es controlado también por la modulación del tono vascular con la producción de NO (inducible NO sintasa), CO (hemo oxigenasa 1), endotelina-1 y adrenomedulina todos los cuales son inducidos por HIF.

Dado el elevado número de genes dependientes de HIF y su implicación en los procesos indicados, no es sorprendente que su desregulación suponga la aparición de diversas alteraciones y patologías como la isquemia cerebral y miocárdica, la hipertensión pulmonar o la progresión del crecimiento tumoral. (Bruick, 2003; Schofield and Ratcliffe, 2004; Semenza, 2001b; Semenza, 2002). La implicación de HIF en todos los procesos anteriormente mencionados, hacen de él un candidato potencial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. De hecho, existen ya varias aproximaciones que se basan en la activación o inhibición de HIF para mejorar ciertas situaciones patológicas. De este modo, se están impulsando dos tipos de terapias. Por un lado, el desarrollo de fármacos que inhiban HIF, o sus genes diana como VEGF, Flt-1, etc, sería aplicable al tratamiento contra el crecimiento tumoral. Para este tipo de patologías, la creación de fármacos que activen las PHDs también tendría una gran aplicación. En el lado opuesto estarían las terapias proangiogénicas, interesantes en patologías asociadas a isquemia y falta de riego sanguíneo, como el infarto de miocardio o diversas enfermedades vasculares periféricas. En este caso, la generación de fármacos activadores de HIF favorecería la formación de nuevos vasos y el restablecimiento del flujo

anguíneo hacia las áreas afectadas. Se ha discutido el posible riesgo de inducir tumores que tendría este tipo de terapia. Sin embargo, hoy por hoy no se ha demostrado que la presencia de HIF *per se* sea suficiente para promover tumorigénesis. Además, una administración local y de corta duración del tratamiento, podría minimizar en parte este riesgo. Dentro de estas estrategias, se incluye el uso de inhibidores de la actividad PHD, que bloquearían la unión de VHL a HIF, favoreciendo la activación del factor. De forma que el desarrollo de este tipo de fármacos abre un nuevo campo dentro del horizonte terapéutico relacionado con HIF (Safran and Kaelin, 2003; Warnecke et al., 2003).

4. PAPEL DE LOS FOSFOLÍPIDOS DE MEMBRANA EN LOS MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.

Los fosfolípidos de membrana por un lado son componentes estructurales imprescindibles para mantener la entidad celular y por otro juegan un papel esencial en los mecanismos de señalización intracelular. Un gran número de estímulos celulares modifican estos fosfolípidos de membrana dando lugar a moléculas derivadas de naturaleza lipídica que funcionan como segundos mensajeros intracelulares (Manifava et al., 2001). Dos de los mensajeros lipídicos generados en respuesta a diferentes estímulos son :

DIACILGLICEROL (DAG)

Este segundo mensajero se genera por la acción enzimática de la fosfolipasa C sobre fosfatidilinositoles (PI-PLC). Es respuesta a hormonas, factores de crecimiento y otros agonistas, estas actividades PLC rompen la estructura del fosfolípido generando por un lado DAG y por el otro el resto de la molécula, inositol trifosfato (Nishizuka, 1992). Uno de los efectos mejor caracterizados de la generación de DAG en membrana es la activación alostérica de ciertas isoformas de PKC (clásicas y novel) por unión directa a sus dominios C1. De modo que el DAG se ha implicado en diversas funciones celulares dependientes de PKC como crecimiento celular, diferenciación o reorganización del citoesqueleto. Mientras que el DAG producido por la ruta de PIP_2 es rápidamente metabolizado, así que la activación prolongada de la PKC depende de una ola de producción más tardía de DAG procedente de la acción coordinada de la Fosfolipasa D (PLD) y la Fosfatasa de Ácido Fosfatídico (PAP). Además, podría proceder de la acción directa de una putativa PLC de PC, (Hodgkin et al., 1998) que generaría DAG y colina-fosfato (C-P) a partir de PC, o bien de la reciente clonada actividad Esfingomielina Sintasa (SMS), que generaría DAG y esfingomielina (SM) a partir de PC y ceramida (Cer). La actividad PC-PLC ha sido caracterizada extensamente en bacterias, pero aún no se han clonado en células de mamífero, de modo que su existencia radica en el uso de un compuesto químico, D609, descrito como inhibidor de estas actividad así como de la SMS en

bacterias (Ito et al., 2002; Preuss et al., 2001; Schutze et al., 1992). Cada uno de los DAG procedentes de las distintas fuentes, están espacial y funcionalmente separados. Por otro lado, el DAG sirve de sustrato a la DGK para generar otro segundo mensajero de gran interés, el PA.

ÁCIDO FOSFATÍDICO (PA)

Este metabolito se ha implicado en la resíntesis de fosfatidilinosítoles consumidos tras la activación por PLC, biosíntesis de fosfolípidos y la remodelación de la membrana (Manifava et al., 2001). Tiene también un papel esencial como segundo mensajero lipídico en determinados procesos biológicos como la regulación de fosforilación de proteínas, la polimerización de actina o modulación del tráfico vesicular (Cross, 1996). El PA puede originarse, además de por las rutas de biosíntesis, por hidrólisis de PC por la fosfolipasa D (PLD), la PLD actúa sobre la fosfatidilcolina generando por un lado PA y por otro colina (Exton 1997), así como por la fosforilación del DAG por acción de la DGK. Por último, el PA puede derivar del ácido lisofosfatídico (LPA) por acetilación de éste. En términos de señalización es importante tener en cuenta no sólo la cantidad de PA generado por estas diversas fuentes (la mayoritaria es la PLD) sino además la localización subcelular de ese PA originado, que puede afectar a su vez a la distribución de las distintas proteínas diana de PA. Las proteínas que regula el PA y sobre las que ejerce su papel de segundo mensajero son diversas kinasas y fosfatasa como SHP-1 (Frank et al., 1999), Raf-1, cuya activación en respuesta a factores de crecimiento requiere PA (Rizzo et al., 1999), mTOR, componente crítico de la señalización dependiente de mitógenos, (Fang et al., 2001), la proteína fosfatasa 1 (PP-1) (Kishikawa et al., 1999), fosfatidilinositol 4 fosfato 5 kinasas (Jenkins et al., 1994), el isotipo ζ de PKC (Limatola et al., 1994), etc...

DIACILGLICEROL KINASA (DGK)

Esta actividad cataliza la fosforilación de diacilglicerol (DAG) para dar lugar a ácido fosfatídico (PA) y por lo tanto modula el balance DAG/PA (Sakane and Kanoh, 1997; Topham and Prescott, 1999; van Blitterswijk and Houssa, 1999). Es un atenuador de las señales dependientes de DAG, ya que disminuye los niveles de DAG y por tanto atenúa la activación de PKCs y de otros efectores intracelulares dependientes de DAG (van Blitterswijk and Houssa, 2000). Es una familia de enzimas bien conservada, se encuentran en especies tan distintas como *Drosophila*, planta y mamíferos. Se ha encontrado actividad DGK en bacterias, pero sin homología con las anteriores y aparentemente no implicada en señalización. En mamíferos se han descrito 9 isoformas, a parte de diversos splicing alternativos, que difieren en su estructura primaria, especificidad por el sustrato y distribución tisular. Todas conservan en su estructura un dominio catalítico conservado y dos dominios ricos en cisteínas necesarios para la actividad. En PKCs un motivo similar sirve para unir ésteres de fórbol o DAG, puede que en DGK sirva para presentar el DAG al dominio catalítico. Los otros dominios funcionales permiten clasificarlas en

inco clases distintas, probablemente permitirán una regulación diferencial de cada tipo. Aunque la explicación más sencilla a la existencia de múltiples isoformas de DGK es la redundancia de sus efectos, las diferencias estructurales entre los distintos subtipos, así como los distintos patrones de expresión tisular, sugieren que estas diferentes isoenzimas deben estar implicadas en múltiples rutas de señalización y funciones celulares relacionadas, pero no solapantes (Sanjuan et al., 2001).

Las DGK fosforilan in vitro distintos DAG con los ácidos grasos en posición 1 y 2 del glicerol, no si están en posición 1 y 3, ni monoglicérols ni ceramida, pero no parecen mostrar especificidad hacia diferentes DAG, excepto la ϵ que es específica para araquidonoil DAG. Puede que la especificidad la dé su localización subcelular, compartimentalización o accesibilidad al sustrato. El mecanismo de activación no está claro y depende de cada isotipo. La translocación a membrana es parte del mecanismo de activación, se ha descrito para la isoforma α pero no es suficiente, puede que requieran de fosforilaciones o de interacción con otras proteínas. Los agentes farmacológicos R59949 y R59022 inhiben in vitro las enzimas purificadas, pero sólo las de tipo I (Jiang et al., 2000). Aunque pudiera parecer que se unen al dominio EF, característico de este isotipo, parece ser que se unen específicamente al sitio catalítico.

El papel de la DGK en los mecanismos de señalización intracelular permanece bastante desconocido. Por una parte implicada en atenuar la señalización mediada por el DAG y por otro promueve mecanismos de señalización propios. El uso de inhibidores específicos ha empezado a clarificar el papel de esta enzima en señalización.

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo se han dirigido a caracterizar cuál es el mecanismo de acción de los agentes farmacológico R59949 y D609 sobre la inhibición de la acumulación de las isoformas α de HIF en hipoxia. Para ello hemos estudiado su efecto sobre los diferentes elementos que componen la ruta canónica de la hipoxia:

- 1) Análisis de la transcripción de los genes de las isoformas α de HIF así como del papel de la proteína VHL en la inhibición de la acumulación de HIF por la inhibición farmacológica del ácido fosfatídico.**
- 2) Caracterización del efecto de los agentes sobre la hidroxilación de HIF y por tanto sobre la interacción VHL-HIF. Papel de las prolina hidroxilasas.**
- 3) Estudio de la transcripción dependiente de HIF tras el tratamiento con los agentes farmacológicos R59949 y D609. Posible efecto sobre la asparagina hidroxilasa FIH que regula la actividad transcripcional de HIF.**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares y condiciones de hipoxia.

Las células de riñón embrionario humanas 293-T, así como las UMRC, RCC y 786-O, derivadas de carcinomas renales humanos, se crecieron en medio RPMI 1640 con GLUTAMAX-I (Life Technologies Ltd.) en presencia de suero de ternera fetal al 10% (FCS) (Labtech International Ltd, Woodside, U. K). Las células Hela de cérvix de cuello de útero se crecieron en medio mínimo esencial Dulbecco (Biochrom KG, Berlín, Alemania) y 5% de suero. Todas se crecieron rutinariamente en condiciones de 95% aire/ 5% CO₂ (condiciones de normoxia) a 37°C. Para exponer las células a hipoxia se situaron en una cámara hermética con válvulas de entrada y salida en la que se insufló una mezcla de gases en proporción 1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂ (S.E.Carbueros Metálicos S.A., Madrid, España) o bien se situaron en una estación de trabajo para hipoxia (*in-vivo* 400 hypoxia workstation (Ruskin Technology, West Yorkshire, U.K)) durante un tiempo variable de 5 a 6 horas. En todos los experimentos las células se sembraron a un nivel de confluencia de entre el 70 y el 90%. En aquellos ensayos en los que se utilizaron inhibidores químicos, éstos se añadieron 60 minutos antes de someter las células a otros tratamientos. Los ensayos realizados con R59949 Calbiochem (La Jolla, CA) se llevaron a cabo en ausencia de FCS, ya que este compuesto se inactiva en presencia de suero. Los experimentos con D609 (Sigma) se realizaron con FCS al 10%.

2. Western Blot.

Para los experimentos de Western Blot, proteínas procedentes de lisados celulares totales se resolvieron mediante electroforesis, usando geles de poliacrilamida-SDS entre el 8-10%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Biorad, CA), que se bloqueó con TBS-T (50mM Tris pH 7.6, 150mM NaCl, 0.1% Tween-20) con 5% de leche en polvo y se incubó durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos correspondientes. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: monoclonal frente HIF-1 α (Transduction Laboratories), monoclonal y policlonal frente HIF-2 α (Novus Biologicals), monoclonal frente a la proteína pVHL (Transduction Laboratories), monoclonal frente α -tubulina de Sigma y monoclonal frente Sp-1 de Santa Cruz. Los anticuerpos secundarios correspondientes, acoplados a peroxidasa se adquirieron de Pierce y de Amersham-Pharmacia Biotech. La unión del anticuerpo fue detectada por quimioluminiscencia potenciada ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, USA) o Supersignal West Femto (Pierce) y visualizada con un analizador digital de imagen (FUJIFILM LAS-1000 CH).

3. Determinación de los niveles de RNA mensajero. Q-RT-PCR:

Inmediatamente después de los tratamientos correspondientes, las células se recogieron en 1ml del reactivo Ultraspec (Biotecx; Houston, Tx, USA). El ARN total se extrajo y fue cuantificado; se controló su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa. A continuación, se retrotranscribió a cDNA (Improm-II reverse transcriptase; Promega) 1µg del ARN total de cada muestra. Se utilizaron de 1 a 3 µl de las muestras de cDNA como molde para las reacciones de amplificación, llevadas a cabo con el kit "LC Fast Start DNA master SYBR Green I". (Roche Applied Science) según las indicaciones del fabricante. Las amplificaciones de PCR se realizaron con un sistema Light Cycler System (Roche Applied Science) y los datos se analizaron con "Light Cycler software 3 version 3.5.28" (Idaho Technology Inc.). Con fines de análisis, cada uno de los genes amplificados fue clonado, y se generó una curva patrón usando cantidades conocidas del producto clonado. El número de copias del gen de interés en cada muestra se extrapoló de la correspondiente curva patrón por el software indicado. Para cada muestra se determinó este valor por duplicado y el número de copias del gen se normalizó por la cantidad de β -actina. Los primers usados han sido descritos previamente por otros autores PHDs, HIF, HIF (Cuevas et al., 2003) ARD1 (CHIN

4. Generación plásmidos recombinantes.

Para la generación de las construcciones que codifican para el dominio de unión a ADN de GAL4 (aminoácidos del 1 al 147)(GAL4DBD) en fase con las secuencias de aminoácidos 530-582 ó 775-826 de la subunidad α de HIF-1, amplificamos estas secuencias mediante PCR con oligonucleótidos que contenían extremos BamHI usando como material sobre el que amplificar un vector de expresión para HIF-1 α (generosamente cedido por el Dr. E.Huang; Brigham&Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston). Las reacciones de PCR fueron realizadas siguiendo las condiciones previamente descritas (Jiang et al 1997). Posteriormente los fragmentos BamHI – BamHI resultantes fueron clonados en un sitio BamHI del vector de expresión de GAL4DBD generándose así las construcciones designadas.

5. Transfecciones transitorias y ensayos de actividad luciferasa:

Para transfectar la línea celular Hela, se crecieron en placas de cultivo de 100mm en medio DMEM suplementado con 10%FCS fueron transfectadas con 13µg de las construcciones pGAL4 DBD o pGAL4DBD(530-582)HIF-1 α y 7 µg del plásmido reportero pGAL4Luc o con 7µg de las construcciones pGAL4 DBD o pGAL4DBD(775-826)HIF-1 α y 13 µg de pGAL4 Luc. Después de 14 u 16 horas en presencia de los precipitados de ADN, las células se lavaron 3 veces y se

replaquearon en placas de 24 pocillos. Transcurridas 12 horas de expresión, las células se pretrataron o no con R59949 y se sometieron a condiciones de hipoxia (1% O₂) o se mantuvieron en normoxia (21% O₂) durante un tiempo de entre 5 y 6 horas. Finalmente, las células fueron lisadas y se analizó la actividad luciferasa según las instrucciones del sistema comercializado por Promega (Madison, WI).

6. Medida de los niveles endógenos de PA.

Los distintos tipos celulares se crecieron en un medio de cultivo sin fosfato suplementado o no con suero fetal de ternera al 10% (previamente dializado contra una solución de NaCl 0.9% (p/v)) durante 90 minutos antes de añadirles [³²P] ortofosfato (100μCi/ml) Amersham-Pharmacia Biotech (Little Chalfont, Buckinghamshire, U.K.) durante otros 90 minutos a 37°C. A continuación las células se sometieron a normoxia o hipoxia durante 5-6 horas. Posteriormente se extrajeron los fosfolípidos por el método de Bligh & Dyer (Bligh and Dyer, 1959) y se separaron por cromatografía en capa fina, utilizando una mezcla de solventes orgánicos de cloroformo:piridina:ácido fórmico(88%) (60:30:7)(v/v/v). Las placas de sílice para la cromatografía en capa fina (TLC) (60 Å, LK6D) fueron suministradas por Whatman (Clifton, New Jersey, USA) Los solventes orgánicos para la cromatografía en capa fina se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania). Las placas de sílice se dejaron secar y finalmente se analizó el contenido de fosfolípidos mediante autoradiografía. La detección del [³²P] PA fue posible gracias al uso de marcadores auténticos de PA patrón de fosfolípidos de ácido fosfatídico 1,2-dioleoil se obtuvieron de Sigma (St. Louis, Missouri, MO), ya que ambos comigran en la TLC. La cuantificación de la banda correspondiente a [³²P] PA, se realizó utilizando el sistema Image Reader v1.8 software (Science Lab software, Fuji Photo Film).

7. Coinmunoprecipitación HIF-VHL

Inmunoprecipitación de VHL de células 786-O-WT10

Placas de 100mm de células 786-O-WT10 se lavaron una vez con PBS y se recogieron. El sedimento celular se resuspendió en 600ml de buffer de lisis de IP (0,5% NP40, 100mM NaCl, 20mM Tris.HCl pH 7,6, 5mM MgCl₂, 10mM pirofosfato sódico, 1mM EGTA pH 8, 1mM ortovanadato, 10mM NaF, 500mM PMSF y un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche)) y se dejaron lisando en hielo durante 15 minutos. Tras centrifugación (1700Xg 15 minutos) los sobrenadantes se pasaron a tubos frescos y se lavaron con Pansorbín (Calbiochem) para evitar uniones inespecíficas durante 30 minutos a 4°C. Se centrifugaron (1700Xg 15 minutos). Los sobrenadantes se incubaron con 10mg de un control negativo de isotipo (IgG1 antiCD45) acoplado

1 bolas de proteína G Sepharosa y se puso a rodar a 4°C durante una hora. Se recogieron las bolas y los sobrenadantes se pusieron en contacto con 5mg de anticuerpo anti VHL acoplado a bolas de Sepharosa y se dejó incubar rodando a 4°C durante toda la noche. Se recogieron las bolas, se lavaron 2 veces con buffer de lisis, una con PBS y se guardaron a 4°C hasta su uso.

Ensayo de unión VHL-HIF

Células deficientes en VHL, 786-O (1-115 o PRC3) y RCC10 se crecieron hasta alcanzar un 90% de confluencia en placas de 60mm. Tras una hora de pretratamiento con R59949 o con D609, se siguieron creciendo en normoxia o en hipoxia 1%O₂ en la cámara workstation durante 5 horas. Se lavaron una vez con PBS y se recogieron en 300ml de buffer de lisis de IP. En el caso de las células que se encontraban en condiciones de 1% la lisis se realizó dentro de la cámara para evitar reoxigenación de los lisados. Tras retirar por centrifugación los restos celulares, los sobrenadantes se incubaron durante 1 hora a 4°C con las bolas de control negativo de isotipo IgG1 que se han saturado previamente con lisados de 786-O-WT10 (ver apartado anterior). Las bolas se recogieron, se lavaron dos veces con buffer de lisis y una con PBS y se reservan en 25 ml de laemly 2X los lisados se les añade entonces el VHL inmunoprecipitado previamente (ver apartado anterior) y se incuban rodando a 4°C durante toda la noche. Las bolas se lavan como las anteriores, se les añade 25ml de laemly 2X y se hierven durante 5 min. Los inmunocomplejos se resuelven en geles SDS-page al 10% junto con las bolas de control de isotipo. Se analizan los resultados por Western Blot usando anti-HIF-1 α anti-HIF-2 α Revelamos también con anti-VHL como control de carga de la inmunoprecipitación.

8. Ensayo de actividad PHD: captura in vitro de VHL.

Tras diferentes tratamientos, células 293-T y 768-O-WT10 se recogieron en PBS y se resuspendieron en 300 ml de buffer hipotónico (20mM Hepes pH 7.6, 5mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 1mM b-mercaptoetanol, 1mM ditiotretitol, 1mM PMSF, 25mg/ml aprotinina, 5mg/ml leupeptina). La suspensión celular se incubó a 4°C durante 15 minutos y luego se fuerza a pasar 10 veces a través de una jeringuilla 22G. Tras retirar los restos celulares por centrifugación, se cuantificó la cantidad de proteína. 10mg de la construcción previamente descrita GST-HIF (521-542) (Naranjo, 200) se incubaron con 10mg de los distintos lisados celulares en un volumen final de 45ml de buffer de reacción ((20 mM Hepes, pH 7.6, 5 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM b-mercaptoetanol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 260 μ M FeCl₂, 5mM 2-oxoglutarato, 0.6 mM ácido ascórbico). Las reacciones se llevaron a cabo en normoxia o en la cámara de hipoxia durante 30 minutos a 30°C. En el caso de las reacciones de la cámara, el buffer de reacción se equilibró previamente durante 2 horas. Las construcciones ya hidroxiladas se recogieron por centrifugación tras añadir a la reacción bolas de glutation-Sepharosa y se resuspendieron en 200 ml de buffer de unión (50 mM Tris, pH

5, 120 mM NaCl, 10% glicerol, 1.5 mM $MgCl_2$, 5mM KCl, 0.2% Nonidet P-40, 0.5 mg/ml b mina bovina). Se añadieron a cada muestra 15ml de $[S^{35}]VHL$ sintetizado *in vitro* utilizando el sistema de transcripción y traducción in vitro TNT (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se incubaron a 4 C durante 1 hora y los complejos de proteínas se recuperaron por centrifugación, se lavaron dos veces con buffer de unión y se resuspendieron en 10ml de laemly 1x. Las muestras se resolvieron por SDS-PAGE. El gel se ti   con azul de Coomassie para analizar la cantidad de carga, se fijaron (metanol 10%, ácido acético 10% y glicerol 10%) durante 30 minutos a temperatura ambiente, se incubó con Amplify (Amersham). La proteína VHL se analizó por autoradiografía.

RESULTADOS

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DEL ÁCIDO FOSFATÍDICO INDUCIDO EN HIPOXIA SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN DE LAS ISOFORMAS α DE HIF Y SOBRE LA PROTEÍNA VHL.

1.1 EL INHIBIDOR DE LA ACTIVIDAD DGK, R59959, AFECTA A LA ACUMULACIÓN DE LA SUBUNIDAD HIF-2 α .

Datos previos generados en nuestro laboratorio indican que la inhibición farmacológica con el inhibidor específico de la actividad diacilglicerol quinasa R59949, del ácido fosfatídico aumentado en hipoxia, previene la acumulación de HIF-1 α (Aragónes et al., 2001). Dado que con anterioridad sólo se había estudiado el efecto de este inhibidor sobre HIF-1 α , nos preguntamos si la inhibición con R59949 afectaba también a la estabilización de HIF-2 α , sugiriendo que la bajada en los niveles de PA estaba afectando a un mecanismo de regulación común a ambos factores. Para esto utilizamos las líneas celulares 786-O-WT10 de carcinoma renal humano y PC12, procedentes de un feocromocitoma de rata, que expresan mayoritariamente la subunidad HIF-2 α , siendo la subunidad HIF-1 α indetectable en ambas.



Figura 4. Efecto de agente inhibidor R59949 sobre HIF-2 α . Las líneas celulares 786-O-WT10 y PC12 fueron pretratadas con R59949 30 μ M (+) o disolvente (Me₂SO) (-) durante 1 hora. Posteriormente fueron incubadas en hipoxia (1%O₂, Hx) o normoxia (21%O₂, N) durante 6 horas. Tras el tratamiento, los niveles de HIF-2 α se determinaron por Western Blot. Como control de carga las mismas membranas se incubaron con anticuerpos anti α -tubulina y anti AKT. Aquí se muestra un experimento representativo.

Tras exponer las células a 6 horas de hipoxia (1%O₂) encontramos que el tratamiento con R59949 era capaz de inhibir específicamente la inducción de HIF-2 α tanto en células 786-O como en PC12. Como control de especificidad se analizaron los niveles de α -tubulina en el caso de las 786 y de AKT en el de las PC12, ninguna de estas proteínas se vio afectada por el tratamiento con R59949 en los mismos lisados celulares (Figura 4).

Dado que la inhibición del diacilglicerol acumulado en hipoxia con el agente D609 también era capaz de regular la acumulación de HIF-1 α , realizamos los mismos experimentos retratando esta vez las células con D609. Como se puede ver en la figura 5, observamos igualmente una inhibición marcada de la acumulación de la subunidad α 2 en hipoxia. Por lo tanto, los mecanismos moleculares que estaban afectando a la acumulación de las subunidades α 1 y α 2 tras la inhibición del PA con estos agentes implicaban a una ruta común en la regulación de HIF.

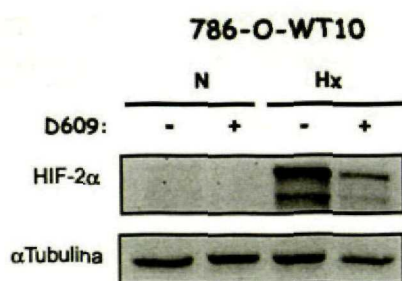


Figura 5. El tratamiento con D609 inhibe específicamente la acumulación de la subunidad α de HIF-2 inducida por hipoxia. Los niveles de las proteínas HIF-2 α y α -tubulina se analizaron por inmunoblot de lisados celulares procedentes de células 786-O-WT10 pretratadas con el disolvente (H₂O) (-) o bien con D609 30 μ g/ml (+) y sometidas a hipoxia (Hx) durante 6 horas.

1.2 R59949 INHIBE ESPECÍFICAMENTE LA ACUMULACIÓN DE LA PROTEÍNA HIF SIN AFECTAR A SUS NIVELES DE mRNA.

Confirmado el que los inhibidores afectaban por igual a las dos subunidades de HIF, decidimos analizar si el efecto negativo observado sobre la acumulación de la proteína HIF era una consecuencia de una inhibición directa de sus niveles de RNA mensajero. Se pretrataron distintas líneas celulares con R59949 antes de su exposición durante 6 horas a hipoxia (1%). Como control, se extrajeron lisados totales y se analizaron por Western blot, confirmando el efecto del inhibidor sobre la acumulación de la proteína en hipoxia. Se aisló mRNA de células tratadas en paralelo. Como se observa en la figura 6, tanto la subunidad HIF1 α como 2 α se inducen tras la estimulación de hipoxia y esta estabilización es inhibida en la presencia de R59949. Como control de la especificidad del agente farmacológico, analizamos los niveles de α -tubulina que presentan los mismos lisados, y observamos que no se afectaban por el tratamiento. La expresión del mRNA de α 1 y α 2 la analizamos por Q-RT-PCR. En todos los tipos celulares estudiados, ni la hipoxia (ya descrito), ni el tratamiento con R59949 modificaban significativamente los niveles de los mRNA de las dos isoformas de HIF. En la parte B de la figura se muestran los niveles de mRNA de la subunidad predominante en cada tipo celular (HIF-1 α en el caso de 293-T y UMRC 3.4, y HIF-2 α en el caso de 786-O-WT8). Como se muestra en la parte C de la figura, el mismo resultado se obtuvo cuando se analizó la isoforma más minoritaria (no detectable por Western blot) en cada caso. Las pequeñas variaciones observadas en algún tipo celular, no justifican la fuerte inhibición observada en los niveles de proteína.

De estos resultados podemos concluir que la inhibición de la acumulación de PA por R59949 no tiene ningún efecto sobre los niveles de mensajero de las subunidades de HIF, pese a la inhibición tan grande que ejerce sobre la proteína. No se muestra, pero los mismos resultados se obtuvieron tras el tratamiento de las células con D609.

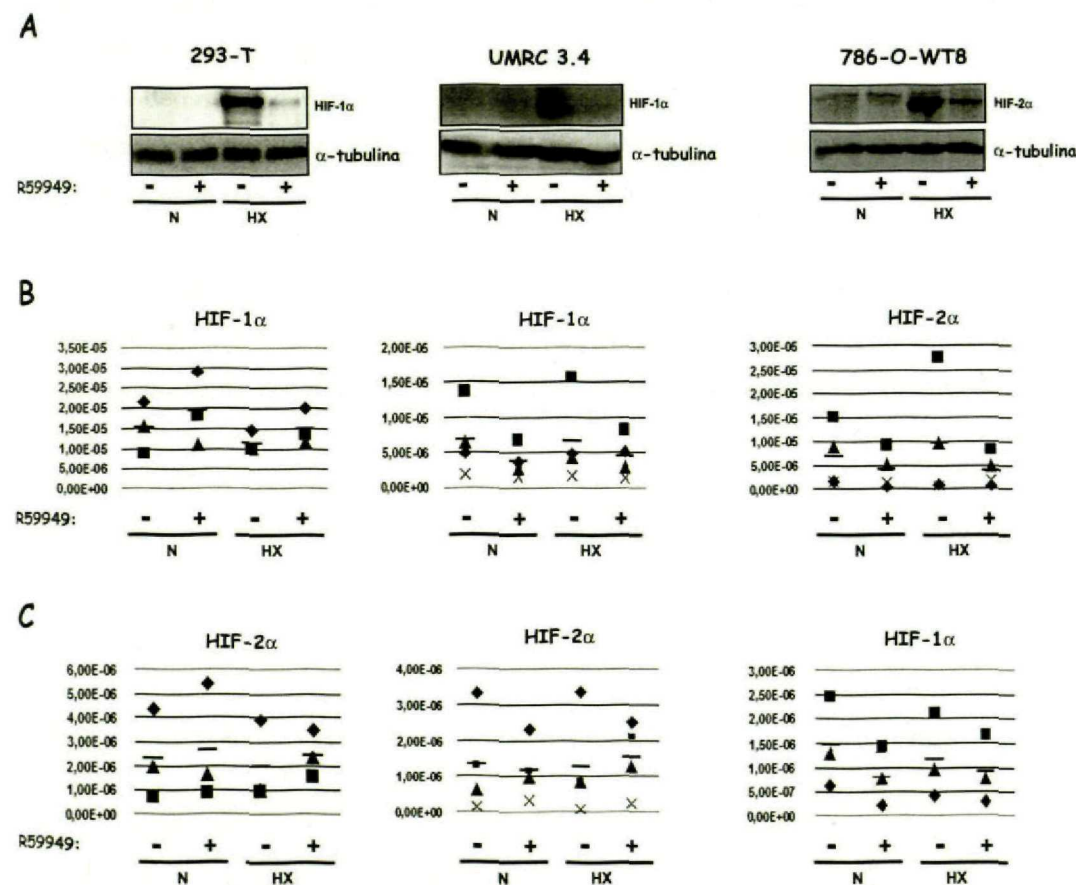


Figura 6. El tratamiento con R59949 inhibe la acumulación de HIF pero no sus mRNAs. Células 293-T, UMRC 3.4 y 786-O-WT8 fueron pretratadas durante 1 hora con R59949 (+) (30μM), o su disolvente, (Me₂ SO)(-) y entonces sometidas a hipoxia (Hx, 1%O₂) o mantenidas en normoxia (N, 21%O₂) durante 5-6 h más. Tras el tratamiento, los niveles de las proteínas HIF-1α y HIF-2α se determinaron por Western blot. Como control de carga, las membranas se incubaron con un anticuerpo anti α-tubulina. En la figura se muestra un experimento representativo (A). En paralelo, se determinó la cantidad de los RNA mensajeros de las dos proteínas por Q-RT-PCR como se indica en materiales y métodos. La cantidad de mensajero de HIF-1α y de HIF-2α se normalizó con el contenido de β-actina en cada muestra. Se muestran en los paneles A y B los valores absolutos obtenidos en tres o cuatro (según el tipo celular) experimentos independientes realizados por duplicado. Se muestran también las medias de los experimentos.

3.3 LA PRESENCIA DE VHL ES NECESARIA PARA EL EFECTO INHIBIDOR DE R59949 SOBRE HIF.

Una vez descartado el efecto negativo del R59949 sobre los niveles de RNA mensajero, y puesto que la proteína VHL desempeña un papel crítico dentro de la ruta canónica de degradación de HIF, investigamos el papel VHL pudiera estar teniendo en la regulación por R59949. Para ello, utilizamos las líneas celulares RCC10 (Ivanov et al., 1998) y 786-O-1-115 (Iliopoulos et al., 1995), previamente descritas y que carecen del gen supresor de tumores *vhl*. La ausencia de VHL implica una acumulación constitutiva de los factores HIFs en normoxia (Ivanov, 1998; Maxwell, 1999), que no se aumenta tras la exposición de las células a hipoxia. El control de estas líneas celulares son los correspondientes clones a los que se les ha reintroducido un vector de expresión de VHL.

Encontramos que en células que carecen de VHL, el tratamiento con diferentes dosis de R59949 no tenía ningún efecto sobre los niveles de HIF-1 α (RCC) o HIF-2 α (786-O) (Figura 7, A y B paneles de abajo). Por el contrario, en las células VHL positivas (Figura 7 paneles de arriba) el efecto del inhibidor era claramente observable a las diferentes dosis. Estos resultados indican que la presencia de VHL es necesaria para la inhibición de la acumulación de las proteínas HIF en hipoxia, dada por R59949. Lo mismo se observó en células tratadas con el agente D609 (*datos no mostrados*).

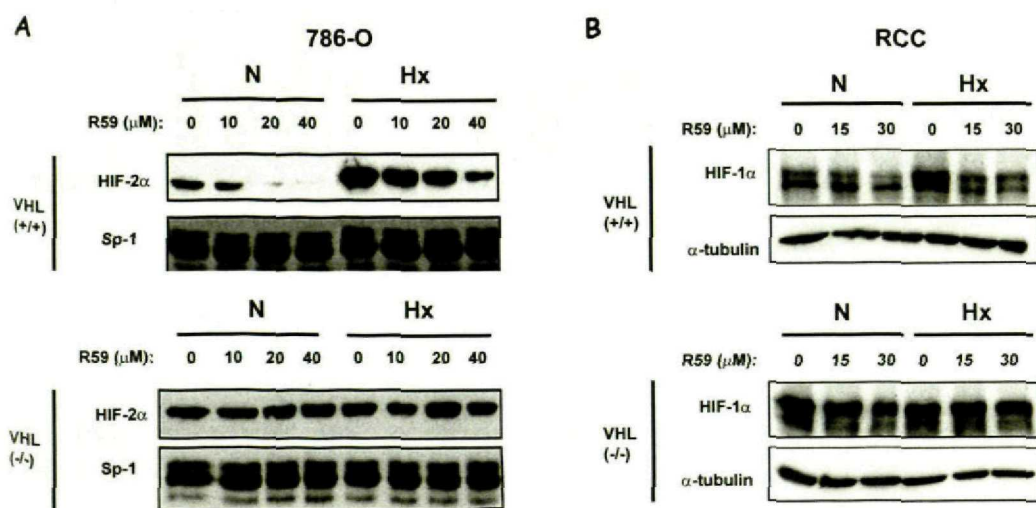


Figura 7. El tratamiento con R59949 no tiene efecto sobre HIF en células VHL negativas. Células 786-O (A) y RCC (B) se pretrataron con dosis del agente R59949 entre 10μM y 40μM, según se indica en cada caso, y se expusieron a hipoxia (Hx, 1% O₂) o se mantuvieron en normoxia (N, 21%O₂) durante 5 h. Después de este tratamiento, se extrajeron lisados totales de las células y se resolvieron por electroforesis (SDS-PAGE). Para analizar el contenido de proteínas HIF, se analizaron por Western blot utilizando anticuerpos específicos para cada uno de los factores (HIF-1 α y HIF-2 α). Como control de carga, se analizaron Sp-1 (A) o α -tubulina (B) en las mismas membranas. Resultados similares a los mostrados se obtuvieron en cuatro experimentos adicionales.

Para descartar una posible no entrada en estas células del inhibidor, y por lo tanto que no estuviera funcionando, se analizaron los niveles de ácido fosfatídico en normoxia y en hipoxia, así como tras el pretratamiento con R59949. Para ello se pretrataron células 786-O, tanto positivas para VHL (WT10) como deficientes en la proteína (1-115), previamente marcadas radiactivamente (Materiales y Métodos), con dosis de R59949 de 30 μ M, y a continuación se analizó el contenido de [32 P] PA en dichas células. Tal y como se observa en la Figura 8, en hipoxia el R59949 inhibe con la misma efectividad el ácido fosfatídico inducido en hipoxia en células deficientes en VHL que en las positivas. Los niveles basales de PA también se ven afectados por el tratamiento con R59949 en ambos tipos celulares, indicando que la conversión de DAG a PA es operativa en condiciones de normoxia, pero fuertemente potenciada tras la exposición celular a hipoxia. Los mismos resultados se obtuvieron en células UMRC 6 y sus correspondientes clones VHL positivos (datos no mostrados).

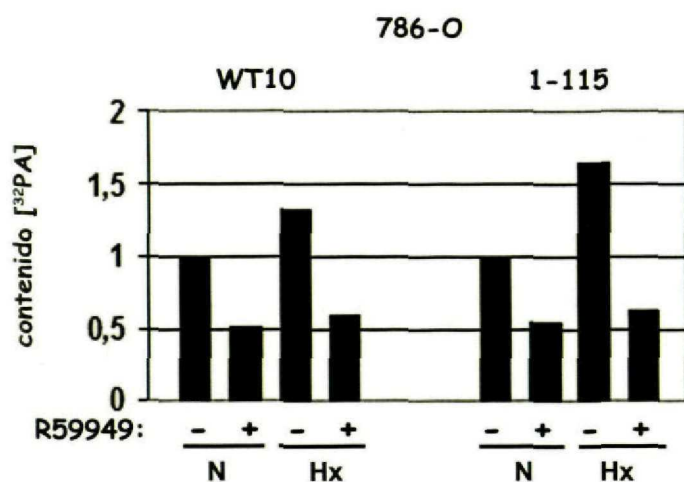


Figura 8. El PA inducido por hipoxia es sensible al tratamiento con R59949 en células deficientes en VHL. 786-O-WT10 (VHL +/+) y 786-O-1-115 (VHL -/-) se marcaron metabólicamente con [32 P]ortofosfato y se incubaron 6 horas en hipoxia tras el pretratamiento con R59949 30 μ M. El contenido de [32 P]Pa se cuantificó relativizando a la cantidad total de material marcado. Asignamos el valor de 1 al valor de PA control, (normoxia) para cada tipo celular. Se muestra la media de dos experimentos realizados por triplicado.

1.4 LA PROTEÍNA VHL NO SE MODULA POR CAMBIOS EN LOS NIVELES DE ÁCIDO FOSFATÍDICO.

Dado que los experimentos anteriores demostraron que la presencia de la proteína VHL es absolutamente necesaria para que la inhibición del PA ejerza su efecto sobre HIF, analizamos los niveles de VHL tras el tratamiento con R59949 para descartar el que la inhibición de PA estuviera aumentando los niveles de VHL y aumentando la degradación de HIF. Dado que algunos grupos han descrito una interacción de VHL con HIF independiente de la hidroxilación, los aumentos de esta proteína por el tratamiento con el agente químico podrían dirigir a HIF al proteosoma pese a

Para descartar una posible no entrada en estas células del inhibidor, y por lo tanto que no estuviera funcionando, se analizaron los niveles de ácido fosfatídico en normoxia y en hipoxia, así como tras el pretratamiento con R59949. Para ello se pretrataron células 786-O, tanto positivas para VHL (WT10) como deficientes en la proteína (1-115), previamente marcadas radiactivamente [Materiales y Métodos], con dosis de R59949 de 30 μ M, y a continuación se analizó el contenido de [32 P] PA en dichas células. Tal y como se observa en la Figura 8, en hipoxia el R59949 inhibe con la misma efectividad el ácido fosfatídico inducido en hipoxia en células deficientes en VHL que en las positivas. Los niveles basales de PA también se ven afectados por el tratamiento con R5949 en ambos tipos celulares, indicando que la conversión de DAG a PA es operativa en condiciones de normoxia, pero fuertemente potenciada tras la exposición celular a hipoxia. Los mismos resultados se obtuvieron en células UMRC 6 y sus correspondientes clones VHL positivos (datos no mostrados).

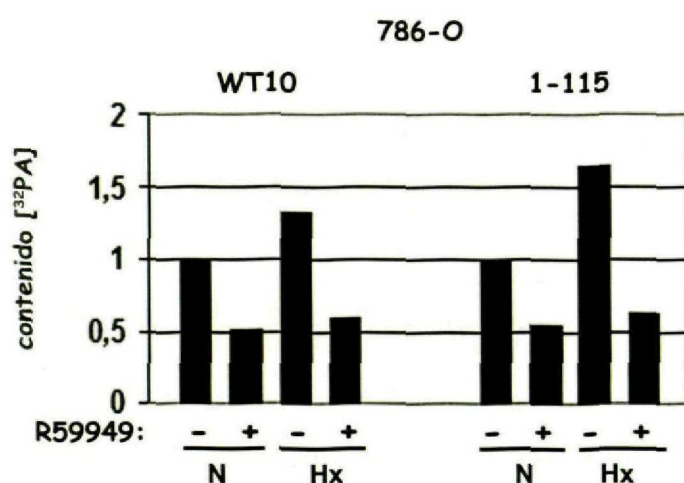


Figura 8. El PA inducido por hipoxia es sensible al tratamiento con R59949 en células deficientes en VHL. 786-O-WT10 (VHL +/+) y 786-O-1-115 (VHL -/-) se marcaron metabólicamente con [32 P]ortofosfato y se incubaron 6 horas en hipoxia tras el pretratamiento con R59949 30 μ M. El contenido de [32 P]Pa se cuantificó relativizando a la cantidad total de material marcado. Asignamos el valor de 1 al valor de PA control, (normoxia) para cada tipo celular. Se muestra la media de dos experimentos realizados por triplicado.

1.4 LA PROTEÍNA VHL NO SE MODULA POR CAMBIOS EN LOS NIVELES DE ÁCIDO FOSFATÍDICO.

Dado que los experimentos anteriores demostraron que la presencia de la proteína VHL es absolutamente necesaria para que la inhibición del PA ejerza su efecto sobre HIF, analizamos los niveles de VHL tras el tratamiento con R59949 para descartar el que la inhibición de PA estuviera aumentando los niveles de VHL y aumentando la degradación de HIF. Dado que algunos grupos han descrito una interacción de VHL con HIF independiente de la hidroxilación, los aumentos de esta proteína por el tratamiento con el agente químico podrían dirigir a HIF al proteosoma pese a

que no estuviera hidroxilado. Mediante ensayos de *western blot* encontramos que el tratamiento con R59949 reducía la aparición en hipoxia de la subunidad α de HIF-1 y de HIF-2, en células UMRC 3,4 y en células 786-O-WT10 respectivamente, sin modular en absoluto los niveles VHL (Figura 9).

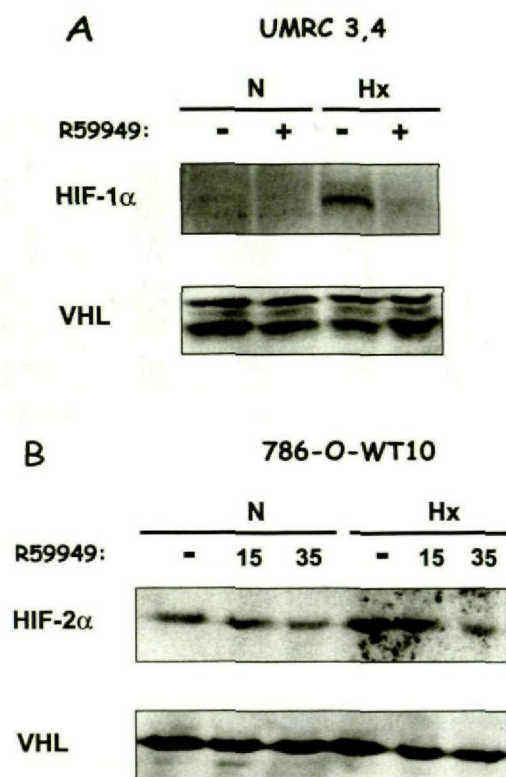


Figura 9. Los niveles de VHL no son variados por los cambios en los niveles de ácido fosfídico.

A, Células UMRC 3,4 se pretrataron con dosis de R59949 de 30 μ M y **B**, células 768-O-WT-10 con dosis de 15 μ M y 35 μ M, y se expusieron a hipoxia (Hx) o se dejaron en normoxia (N) durante 5 horas. Tras el estímulo se resolvieron los lisados totales en SDS-PAGE al 10% y se analizaron los niveles de HIF-1 α o 2 α y los de VHL. También se analizó el contenido en α -tubulina de cada membrana para controlar las diferencias de carga (no se muestra).

1.5 R59949 NO TIENE NINGÚN EFECTO SOBRE LOS NIVELES DE mRNA DE LA ACETILTRANSFERASA ARD-1

Recientemente se ha planteado la acetilación de la lisina 532 de HIF-1 α como una modificación postraducciona esencial en la regulación de HIF (Jeong et al., 2002). Parece que la acetilación en normoxia de HIF por ARD1 favorece el reclutamiento de VHL y por lo tanto la degradación de HIF. El grupo que lo describió plantea que la bajada de la acetilación en hipoxia se debe a la bajada que sufren los niveles de proteína por la disminución del mRNA de ARD1. Decidimos mirar si el tratamiento con R59949 prevenía esta disminución en la proteína y por tanto mantenía la cantidad de acetilación y por ello no se estabilizaba HIF en hipoxia. Para ello analizamos los niveles de mensajero de esta acetiltransferasa en distintos tipos celulares, utilizando las sondas descritas en el artículo que describió esta regulación. Como se observa en la figura 10, no observamos ningún tipo de regulación del mensajero de la acetiltransferasa por hipoxia y ninguna variación tras el tratamiento con R59949. Obtuvimos los mismos resultados al utilizar una

sonda diferente a la publicada (*datos no mostrados*). Por lo tanto parecía que R59949 no estaba afectando a la estabilización de HIF de esa manera.

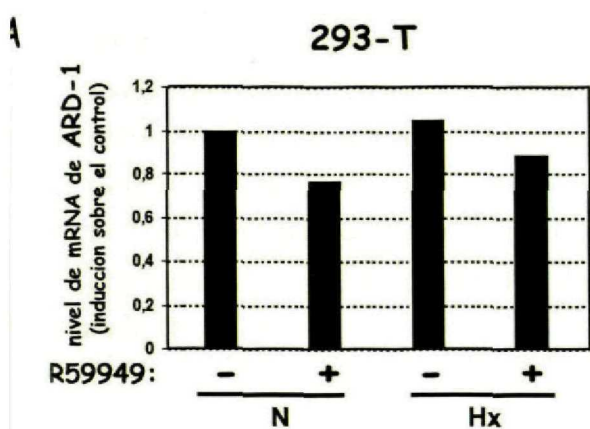
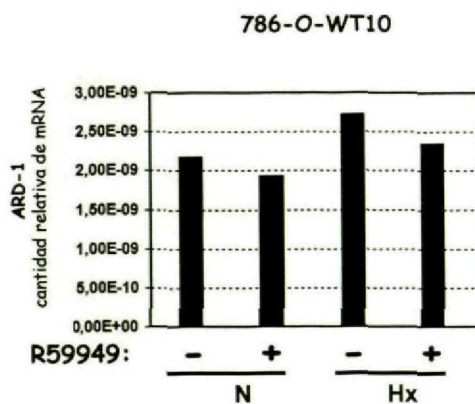
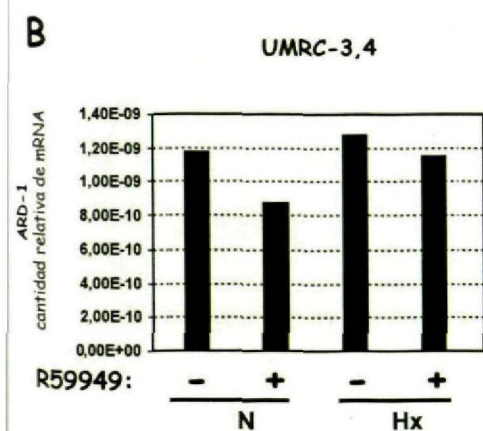


Figura 10. El tratamiento con R59949 no tiene efecto sobre los niveles de mRNA de la acetiltransferasa ARD1. Se pretrataron los distintos tipos celulares indicados en cada caso, con 30 μ M R59949 (+) o su disolvente (-) y se expusieron a hipoxia o normoxia durante 6 horas. Se extrajo el mRNA total y se determinó el nivel de mRNA de ARD-1 en cada condición por Q-RT-PCR. Los valores se normalizaron por el valor de β -actina en cada caso. En todos los experimentos se controló el efecto del inhibidor por Western Blot.

A. Asignamos el valor de 1 a la normoxia (-) y las otras muestras se normalizaron respecto a ésta. Se muestra la media de tres experimentos realizados en duplicado.

B. Se muestran los valores relativos obtenidos en un experimento realizado en duplicado.



2. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE R59949 SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS PHDS

2.1 ESTUDIO DE LA UNIÓN VHL-HIF.

Dado que la presencia de VHL era necesaria para observar el fenómeno inhibitorio producido por el agente R59949, nos planteamos que un posible mecanismo por el que el R59949 podría estar reduciendo los niveles de HIF podría ser promoviendo la interacción entre HIF y VHL y por lo tanto, favoreciendo la ubiquitinización de HIF y su degradación por el proteosoma. Para realizar estos experimentos utilizamos una aproximación experimental que permita mantener estabilizadas las distintas modificaciones postraduccionales de HIF tras los tratamientos celulares sin que se desencadene el proceso de ubiquitinización y degradación. Así, utilizamos como fuente de HIF células deficientes en VHL y usamos células VHL positivas como fuente exógena de VHL (ver esquema Figura 11).

ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN HIF-VHL EN CÉLULAS DEFICIENTES EN VHL

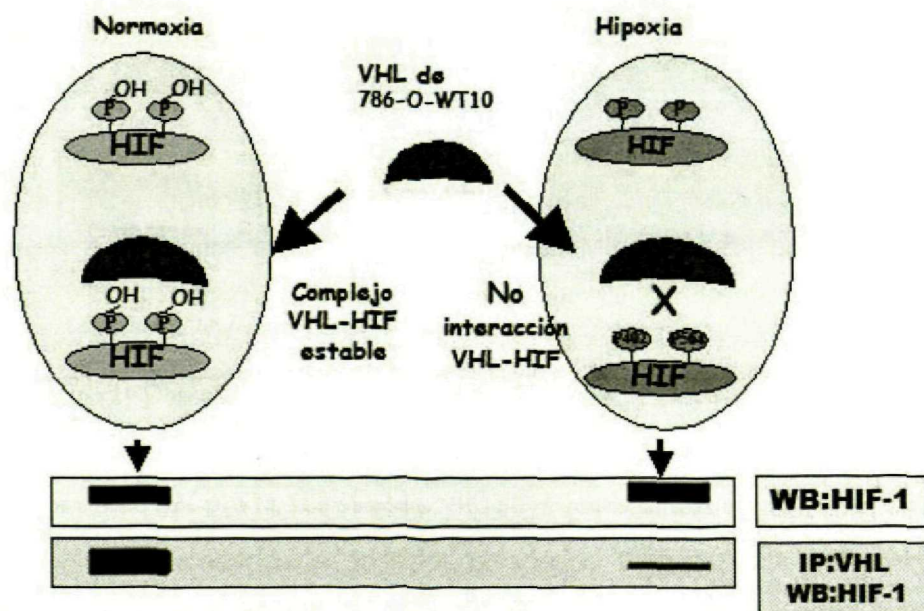


Figura 11. Modelo para el estudio de la interacción VHL-HIF.

Como se explica en el esquema, lisados celulares de las células VHL-negativas a las que sometemos a distintos tratamientos, se ponen en contacto con la proteína VHL inmunoprecipitada de 786-O-WT10. La interacción o no entre VHL y HIF se estudia por Western Blot tras resolver los inmunocomplejos en un gel. Como mostramos en la figura 12, en condiciones de normoxia VHL se une a HIF-1 α en RCC10 (A) así como a HIF-2 α en 786-O-1-115 y 786-O-PRC3 (B, *data not shown*) y en condiciones de hipoxia esta unión prácticamente no se observa ya que HIF no se encuentra hidroxilado y por tanto se pierde la interacción con VHL. En las células que además eran tratadas con R59949 se observó que en normoxia la unión de HIF a VHL aumentaba, tanto en la isoforma 1 α como en la 2 α . Cuando se realizaron estos experimentos en condiciones de hipoxia tras el pretratamiento con R59949, había una recuperación de la presencia tanto de HIF-1 α como de HIF-2 α , indicando que en hipoxia, donde la interacción VHL-HIF estaba disminuida, el tratamiento con el agente químico reforzaba dicha interacción.

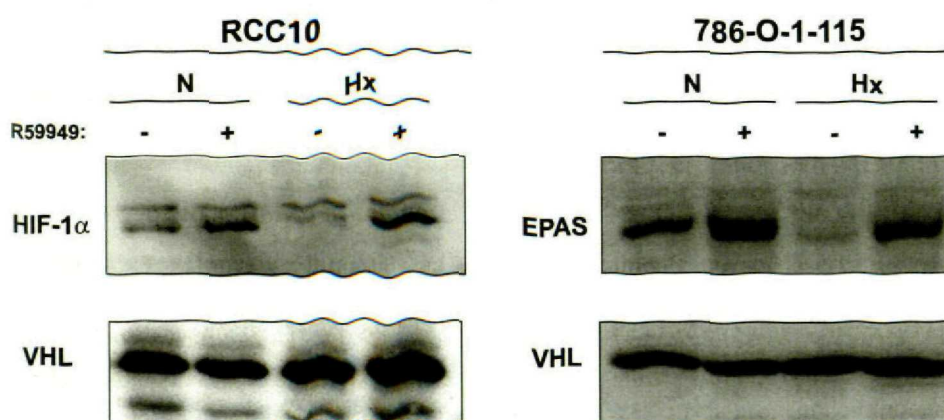


Figura 12. El tratamiento con R59949 promueve la unión de VHL a HIF. Células deficientes en VHL, RCC10 (A) y 786-O-1-115 (B), se expusieron a hipoxia (Hx, 1% O₂) o se mantuvieron en normoxia (N, 21%O₂) durante 5 h en presencia de R59949 (+) (30 μ M) o su disolvente (-) (Me₂ SO). Después del tratamiento, se extrajeron lisados celulares con el uso del buffer IP, descrito en materiales y métodos. A estos lisados se les añadió la misma cantidad de proteína VHL inmunoprecipitada de células positivas para VHL, 786-O-WT8. Los complejos VHL-HIF formados en cada muestra (con el VHL procedente de 786-O-WT8 y las subunidades α 1 y α 2 de los correspondientes tipos celulares), se coimmunoprecipitaron, se resolvieron por SDS-PAGE. Los niveles de HIF-1 α (A) y HIF-2 α (B) unidos a VHL se analizaron por Western blot. Como control de carga de la inmunoprecipitación, las membranas se revelaron con anticuerpo anti-VHL. Se muestra un experimento representativo de cuatro de los realizados en cada uno de los tipos celulares.

Es importante resaltar que el incremento que se observa en los complejos VHL-HIF en normoxia en presencia del agente químico, demostrarían que R59949 está facilitando la

interacción VHL-HIF tanto en normoxia como en hipoxia, lo que explicaría la inhibición que se observa en normoxia de los niveles basales de HIF que según las condiciones celulares aparecen. En todos los experimentos, el correcto funcionamiento de la estimulación por hipoxia, así como la eficiencia de la inhibición por R59 se confirmó en células VHL positivas, en las que por Western Blot se monitoriza la sensibilidad al tratamiento.

Cuando experimentos similares se realizaron utilizando el inhibidor de las actividades SMS/PCPLC, D609, encontramos que el tratamiento con este agente también aumentaba la formación de complejos VHL-HIF (*datos no mostrados*). Estos resultados sugieren que, la inhibición del acúmulo de PA en hipoxia tras el tratamiento con R59949 aumenta directamente la habilidad de VHL de unirse a las dos isoformas de HIF, HIF-1 α y HIF-2 α , dirigiéndolas a su degradación por el proteosoma.

Dado que en este tipo de experimentos el tratamiento con los agentes químicos se realiza sobre las células de las cuales procede HIF, estos datos demuestran además que el efecto observado es debido a una modificación sobre HIF que facilitaría su interacción con VHL. De hecho cuando estos experimentos se realizaron tratando con R59949 solamente las células de las cuales se obtenía VHL, no se observó una mayor interacción VHL-HIF indicando que el efecto no se debía a una modificación acontecida en VHL (*datos no mostrados*).

2.2 R59949 ESTIMULA LA ACTIVIDAD DE LAS PHDS.

Una vez que encontramos que el tratamiento con R59949 promovía la unión de VHL a HIF, y descartado el efecto sobre VHL, nos preguntamos si este aumento en la interacción podría deberse a un efecto sobre el estado de hidroxilación de HIF. En condiciones de normoxia, las prolinas de los motivos LXXLAP, situadas en posiciones 402 y 564 de cada uno de los motivos en HIF-1 α y 403 y 531 en los correspondientes de HIF-2 α , son hidroxiladas por las PHDs. La hidroxilación de estos residuos es crítica para la interacción HIF-VHL y su consiguiente degradación. Cuando las células se exponen a hipoxia, la actividad PHD se ve fuertemente inhibida y las subunidades no pueden ser hidroxiladas lo que conlleva la no asociación con VHL y por lo tanto la estabilización de las subunidades α de HIF.

Decidimos estudiar la actividad de estas enzimas en presencia de R59949. Para este estudio, utilizamos un ensayo de medida indirecta de la actividad hidroxilasa, llamado de *captura de VHL*. Analizamos indirectamente la actividad PHD en lisados de diferentes tipos celulares sometidas a hipoxia o mantenidas en normoxia, en presencia o no del inhibidor. Como VHL une sólo HIF cuando las prolinas han sido hidroxiladas, la unión de VHL-S³⁵ sintetizado en un sistema de reticulocitos a un péptido derivado de HIF conteniendo la prolina 531 ó 564 se considera una

medida indirecta de la actividad PHD (Ref). Para ello, la construcción GST-HIF-2 α comprendiendo los aminoácidos 521-542, que incluye la prolina 531, se expuso a lisados celulares procedentes de distintos tratamientos. Los lisados celulares se obtienen de manera que se mantiene la actividad hidroxilasa presente en el lisado. Tras esta reacción, las diferentes muestras se expusieron al VHL-S³⁵ y la captura de VHL se consideró directamente proporcional a la actividad PHD presente en el lisado. El ensayo se realizó con lisados de 786-O-WT10 tratadas o no con R59949. Como se muestra en la Figura 13, R59949 aumenta fuertemente la actividad PHD sobre los lisados basales de normoxia cuando la reacción de hidroxilación se lleva a cabo a concentración de oxígeno ambiental (21%). Cuando los mismos lisados se ensayaron en un ambiente hipóxico, (1%), dentro de una cámara de hipoxia, como es esperable, encontramos que la actividad PHD se reducía respecto al valor obtenido al 21%. Interessantemente, R59949 era capaz de aumentar la unión y por lo tanto la actividad incluso en estas condiciones restrictivas de oxígeno.

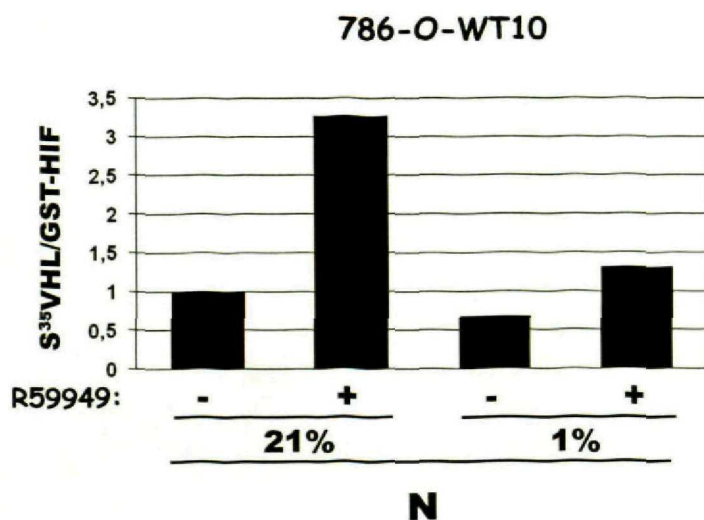


Figura 13. La actividad PHD es estimulada por el tratamiento con R59949. Lisados de células 786-O-WT10 mantenidas en normoxia y tratadas con 30mM de R59949 (+) o su disolvente (-) durante 5 horas se usaron para determinar la actividad PHD por un ensayo de captura de VHL como se indica en Materiales y Métodos. La misma cantidad de lisado se ensayó en paralelo al 21% y al 1% de oxígeno. La cantidad de S³⁵VHL capturada por la construcción GST-HIF incubada sólo con buffer de lisis se consideró fondo y se restó a las demás muestras. Asignamos el valor de 1 al nivel de actividad de PHD obtenido cuando los lisados de normoxia sin tratar se ensayaron a la concentración de oxígeno de 21%, el resto de las muestras se normalizaron respecto a este valor. Para controlar las condiciones lineales en este ensayo, se expuso GST-HIF al doble de concentración de lisado control, observándose alrededor del doble de captura de S³⁵VHL en este caso (datos no mostrados). Aquí se muestra un experimento representativo de cuatro más.

Después de esto, decidimos analizar si el efecto del agente era patente también cuando el ensayo se llevaba a cabo con lisados de células sometidas a hipoxia. Como la PHD2 y la PHD3 son genes dependientes de HIF, analizamos primero los niveles de sus mRNAs en hipoxia para considerar los aumentos en los niveles de proteína entre esos lisados y los de normoxia, ya que estas diferencias se iban a reflejar en la actividad de cada lisado. Como R59949 elimina la transcripción dependiente de HIF, también determinamos el efecto del inhibidor sobre los mRNAs de las PHDs. Como se muestra en la Figura 14, los niveles de mensajero de PHD3 y PHD2 se inducen fuertemente tras la estimulación con hipoxia en 293-T y este incremento es eliminado cuando las células son tratadas con R59949. Como control de la especificidad en estos experimentos se analizaron los niveles de mensajero de PHD1, que es independiente de HIF. En este caso, ni la hipoxia ni el tratamiento con R59949 modificó los niveles de mRNA. Estos mismos resultados se obtuvieron cuando se realizaron los experimentos en 786-O-WT10 (datos no mostrados).

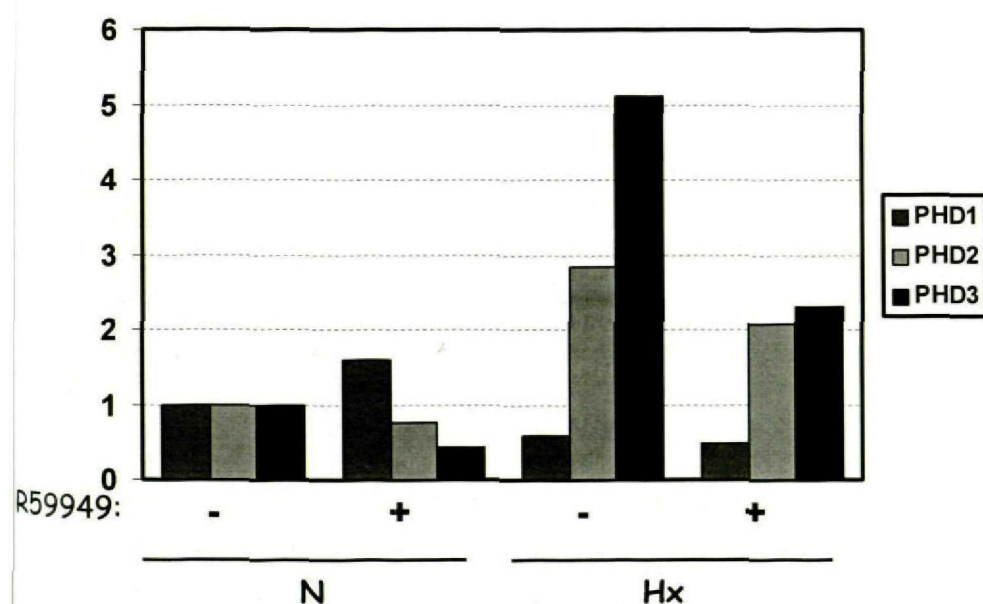


Figura 14. R59949 inhibe la acumulación de los mRNAs de PHD2 y PHD3 en hipoxia.

Células 293-T se pretrataron durante una hora con R59949 30mM (+) o su disolvente (DMSO) y espuestas a hipoxia (Hx, 1%O₂) o mantenidas en normoxia (N, 21%O₂) durante 5 horas. Terminada la estimulación se extrajo su RNA y los niveles de mRNA de las PHDs se terminaron por Q-RT-PCR como se explica en Materiales y Métodos. El nivel de PHD se normalizó por el contenido en β -actina en cada caso. Asignamos el valor de 1 al nivel de PHD en la muestra control (normoxia sin tratar). El valor del resto de las condiciones se expresó como la inducción sobre éste. Se muestra un experimento realizado en duplicado; se obtuvieron los mismos resultados en células 786-O-WT8 (*data not shown*).

Cuando ensayamos la actividad PHD en estos lisados (Figura 15, A) la unión VHL-HIF aumentaba enormemente cuando GST-HIF era incubado al 21% con lisados de células 293-T que habían sido previamente expuestas a 6 horas de hipoxia. Estos datos están en concordancia con lo publicado (del Peso et al.,) de que el aumento de los mensajeros de PHD2 y 3 en hipoxia conlleva un aumento en la actividad PHD de cuando los lisados son ensayados en normoxia y por lo tanto con total disponibilidad de oxígeno.

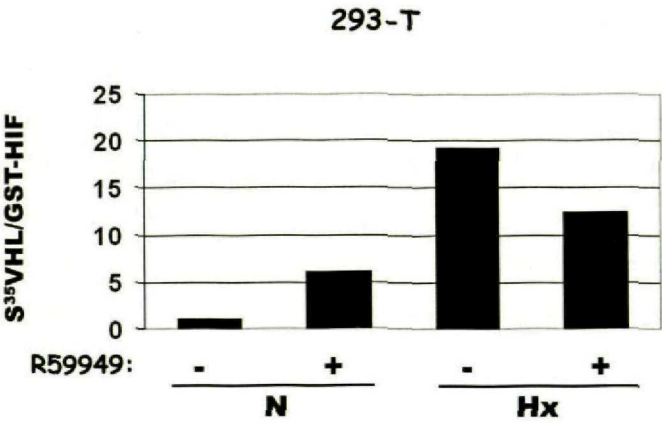


Figure 15. El tratamiento con R59949 estimula la actividad PHD de células en hipoxia así como en normoxia. Células 293-T se pretrataron con 30 μ M of R59949 (+) o con el disolvente (-) (Me_2SO), y se expusieron a hipoxia (Hx, 1% O_2) o permanecieron en normoxia (N, 21% O_2) durante 5 h. Tras los tratamientos, se recogieron las células y se determinó la actividad PHD de cada lisado por un ensayo de captura de VHL como se explica en MM. La cantidad de S^{35} VHL capturado por la construcción GST-HIF expuesta simplemente a buffer de lisis se consideró el back ground del experimento y se restó al resto de las muestras. Asignamos el valor de 1 al nivel de actividad obtenido cuando se analizaron los lisados de normoxia. El valor de cada una de las otras condiciones se expresa como la inducción sobre este control. Todas las reacciones de hidroxilación se realizaron en condiciones de O_2 atmosféricas (21% O_2). Se obtuvieron los mismos resultados en estas células en dos experimentos más.

En el caso de las células tratadas con R59949 y expuestas a hipoxia, encontramos que la unión de VHL a GST-HIF no alcanzaba el grado observado en hipoxia, pero considerando la total inhibición de los mRNAs de las PHD2 y PHD3 que se observa en esas células, podemos asumir que la actividad PHD está siendo estimulada por el tratamiento con R59949. En realidad, si representáramos la actividad PHD considerando las variaciones en el total de sus mRNAs tras los tratamiento observaríamos que R59949 induce de manera dramática la unión de VHL a GST-HIF. Los mismos resultados se observaron en otros tipos celulares.

Todos estos resultados en conjunto con los datos previos aquí mostrados, nos permiten postular que R59949 es capaz de inducir la actividad PHD.

3. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA INHIBICIÓN DEL PA INDUCIDO EN HIPOXIA EN LA TRANSCRIPCIÓN DEPENDIENTE DE HIF.

3.1 EL INHIBIDOR DE LA ACTIVIDAD DGK R59949 REDUCE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE LOS DOS DOMINIOS DE TRANSACTIVACIÓN DE HIF-1 α

Hemos determinado el papel de R59949 sobre la actividad de las PHDs y por lo tanto sobre la estabilización de HIF y hemos visto por lo tanto su efecto sobre genes muy dependientes de la activación transcripcional de HIF como son las PHDs. Pero la estabilización de HIF no es suficiente para una completa inducción de la transcripción dependiente de HIF. Se requiere la activación en respuesta a hipoxia de sus dos dominios de transactivación localizados entre los aminoácidos 530-582 (NTAD) y 775-826 (CTAD) de la subunidad α de HIF-1 α (Jiang 1997, Pugh 1997). El dominio situado más N-terminal se encuentra dentro del ODD, por lo que su actividad transcripcional correlaciona con la estabilidad de la proteína, mientras que el situado en el extremo C-terminal es constitutivamente activo cuando se expresa como dominio aislado, pero su actividad se induce al situarlo en condiciones de hipoxia (O'Rourke et al., 1999).

Hemos analizado el efecto de R59949 sobre la transcripción promovida por ambos dominios de transactivación en respuesta a hipoxia. Para ello cotransfectamos células Hela con los vectores de expresión que codifican para uno u otro dominio fusionados en fase con el dominio de unión a ADN (DBD) de la proteína GAL4 (GAL4DBD(530-582)HIF-1 α y GAL4DBD(775-826)HIF-1 α), junto con el plásmido reportero pGAL4Luc. El pretratamiento con R59949 inhibe gradualmente la actividad transcripcional dependiente de ambos dominios en respuesta a hipoxia, sin afectar a su actividad transcripcional en normoxia (Figura 16). Estos experimentos también han revelado que ambos dominios se afectan por R59949 de manera diferente. Así la transcripción dependiente de (775-826)HIF-1 α en hipoxia es completamente inhibida en presencia de R59949 (10 μ M) Mientras que la misma dosis de R59949 solo produce una reducción parcial de la transcripción dependiente de la secuencia (530-582)HIF-1 α . Como control de la especificidad se analizó la actividad transcripcional en células contrasfectadas con pGAL4 DBD y Gal4Luc, que se afectó con la mismas dosis de R59949, tanto en normoxia como en hipoxia.

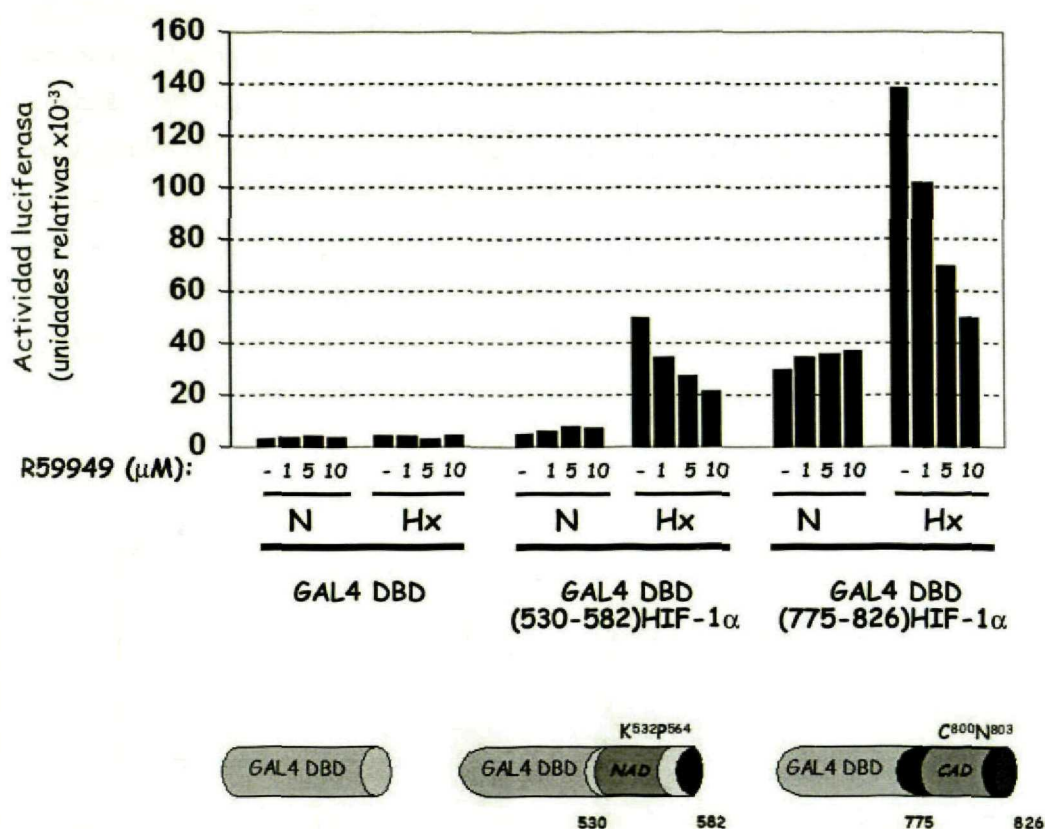


Figura 16. El inhibidor R59949 reduce la actividad de los dominios de transactivación de HIF-1α. Células Hela fueron transfectadas con pGAL4 Luc con GAL4-DBD, GAL4DBD (530-582) o GAL4DBD (775-826). Tras la transfección con fosfato cálcico, las células fueron preincubadas con las dosis indicadas de R59949 o el disolvente DMSO antes de la incubación durante 6 horas en hipoxia o normoxia. Después del tratamiento las células fueron lisadas para ensayar la actividad luciferasa. Cada barra representa la actividad luciferasa de duplicados extractos. Resultados similares se obtuvieron en 4 experimentos independientes.

3.2 EL TRATAMIENTO CON R59949 Y D609 BLOQUEA LA TRANSCRIPCIÓN DEPENDIENTE DE HIF EN CÉLULAS DEFICIENTES EN VHL. PAPEL SOBRE FIH.

Además de las hidroxilación en prolina por las PHDs, HIF es hidroxilado también en un residuo de asparagina localizado en el dominio C-terminal de activación transcripcional. FIH es un miembro de las dioxigenasas dependientes de (II)-hierro y 2 oxoglutarato y es la enzima responsable de esta hidroxilación. FIH controla la actividad transcripcional de HIF, ya que la hidroxilación en asparagina regula la unión al factor del coactivador general de la transcripción CBP/p300. Para estudiar el posible papel positivo de R59949 sobre esta actividad hidroxilasa dado que FIH se ha descrito que tiene los mismos requerimientos enzimáticos que las PHDs, investigamos el efecto de R59949 sobre la actividad transcripcional de HIF aislándola de la

regulación de la estabilización de la proteína. Para ello decidimos usar células deficientes en VHL, ya que, como se ha mostrado en la Figura 7, no muestran inhibición de la proteína HIF cuando se tratan con R59949. Así los cambios que observemos en los genes dependientes de HIF en esas células se pueden atribuir a modificaciones en la actividad transcripcional de HIF y por lo tanto podemos sugerir que a la actividad de FIH. Como PHD3 como hemos observado anteriormente y ha sido previamente descrito, es un gen muy dependiente de HIF (JBC), monitorizamos es efecto del tratamiento con R59949 sobre el mRNA de este gen en células 780-O-1-115. Para confirmar que estas células presentan niveles basales elevados de estos genes, analizamos su contenido en el mRNA de PHD3 en comparación con sus correspondientes células positivas.

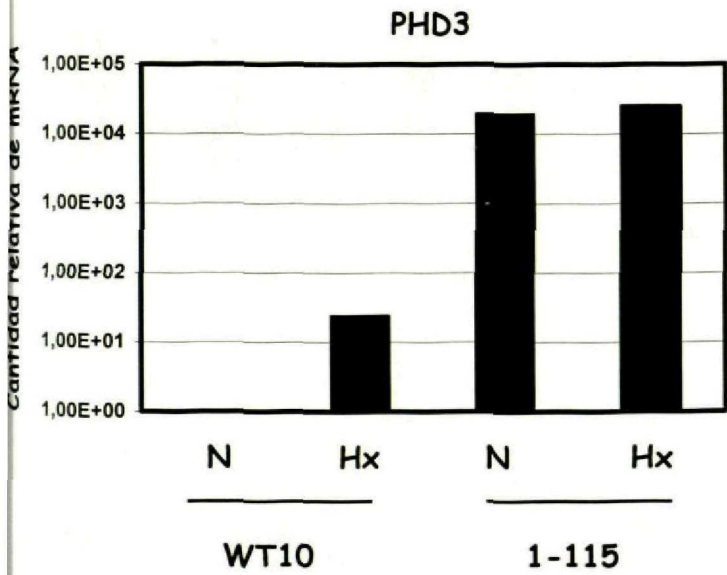


Figura 17. Las células VHL negativas tiene activada la transcripción dependiente de HIF. Células 786-O WT10 y 1-115 se cultivaron durante 6 horas en condiciones de normoxia (N) o hipoxia. El nivel de mRNA de PHD3 se determinó por Q-RT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. La cantidad de mRNA de PHD3 se normalizó por el contenido en β -actina en cada caso. Se muestra la media de dos experimentos realizados en duplicado.

Como se muestra en la Figura 17, las células VHL negativas tienen activada la transcripción dependiente de HIF dada la acumulación de la proteína que presentan. Aunque en la gráfica no queda muy patente por las unidades en que se representa, estas células aumentan aún más la transcripción dependiente de HIF en hipoxia, por la inhibición de FIH en esas condiciones. Para analizar el efecto de la inhibición del ácido fosfatídico en estas células, cultivamos 1-115 en normoxia y en hipoxia, pretratándolas tanto con R59994c como con D609. Tal y como puede observarse en la Figura 18, (panel de arriba), R59949 bloquea significativamente los niveles aumentados de PHD3 mRNA observados en estas células. Por el contrario, el mensajero de PHD2, cuyos niveles no dependen de HIF, no se afecta con el tratamiento con R59949 en la misma muestra. Al tratar las células con D609 observamos los mismos resultados Fig5 B. Estos resultados

sugieren que los dos inhibidores estimulan la actividad asparaginil hidroxilasa incluso en condiciones de normoxia.

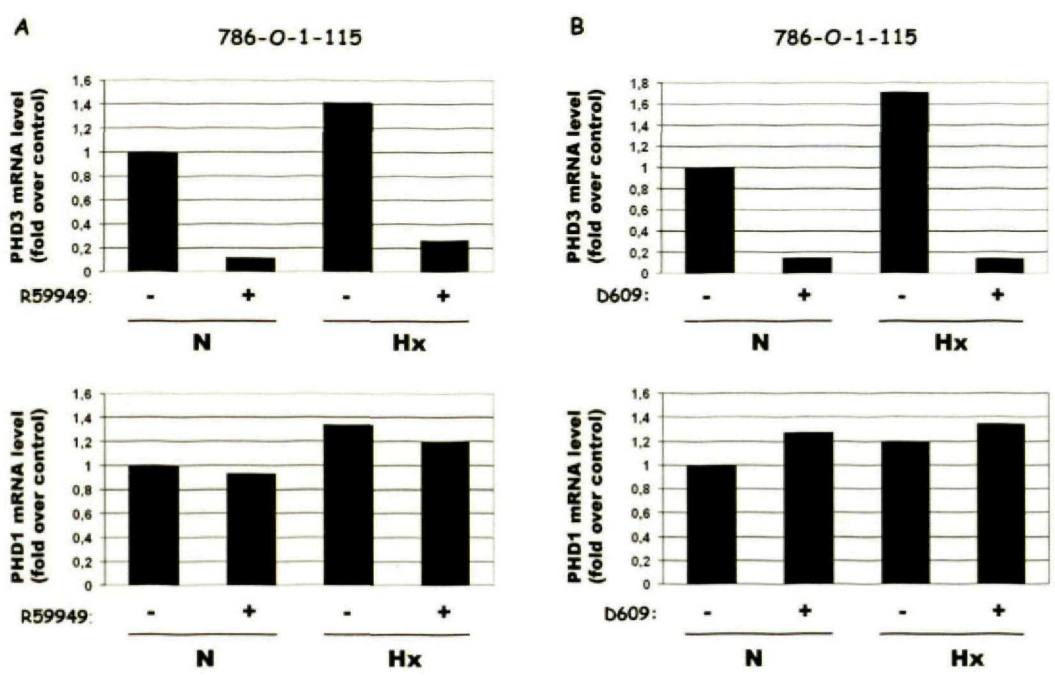


Figura 18. La actividad transcripcional de HIF se bloquea tras el tratamiento con R59949 y con D609 en células VHL negativas. Se cultivaron células 786-O-1-115 deficientes en la proteína VHL hasta un 90% de confluencia (A) Las células se pretrataron 30 μ M de R59949 (+) o disolvente (Me_2SO) o (B) 20 μ g/ml de D609 (+) o su disolvente (-) (H_2O), y se expusieron a hipoxia (Hx, 1% O_2) o se dejaron en no (N, 21% O_2) durante 5 h. Se extrajo el mRNA total y se analizaron los niveles de PHD3 mRNA (*upper panels*) o PHD2 mRNA niveles (*lower panels*) tras los diferentes tratamientos, por Q-RT-PCR. Los valores obtenidos se normalizaron por el contenido de β -actin en cada muestra. Asignamos el valor de 1 a los niveles de mRNA observados en la normoxia sin tratar y el resto de las muestras se normalizaron sobre este valor. Mostramos la media de dos en el caso del panel (A) o tres (B) experimentos independientes hechos en duplicado.

En esta parte del trabajo hemos encontrado que la inhibición de su acumulación de PA tras la hipoxia activa las PHDs y parece modular la activación transcripcional de HIF, lo que sugiere que también podría activar a FIH. Todas estas observaciones nos llevan a hipotetizar que el PA inducido en condiciones de baja tensión de oxígeno podría estar implicado en la regulación de las hidroxilasas de HIF.

DISCUSIÓN

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DEL ÁCIDO FOSFATÍDICO INDUCIDO EN HIPOXIA SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN DE LAS ISOFORMAS DE HIF Y VHL.

Datos previos generados en nuestro laboratorio indican que el tratamiento con el inhibidor de actividad DGK, R59949, afecta tanto a la acumulación de PA como a la activación de HIF-1 α en hipoxia, por lo que el PA vía DGK parece jugar un papel esencial en la regulación de HIF-1 α . En este trabajo hemos intentado dilucidar cuál es el mecanismo de acción de este agente farmacológico sobre HIF, y para ello hemos estudiado su efecto sobre los diferentes elementos que componen la ruta canónica de la hipoxia.

Dado que sólo se había estudiado el efecto de este inhibidor sobre HIF-1 α , decidimos investigar primero si la inhibición con R59949 afectaba también a la estabilización de HIF-2 α , sugiriendo que la bajada en los niveles de PA estaba afectando a un mecanismo de regulación común a ambos factores. Utilizando células que presentan HIF-2 α comprobamos que el inhibidor disminuía de manera dramática los acúmulos de esta isoforma. También se bloqueaba la inducción del uso de D609, agente farmacológico que inhibe las actividades enzimáticas SMS y/o PC-2.

Se ha descrito que la fuerte acumulación de las isoformas de HIF en hipoxia no depende de la modulación de los niveles de sus mRNAs, pero sí que se ha descrito esta regulación para otras proteínas como el VEGF. Estudiamos el posible papel regulador de R59949 sobre los niveles de mensajero de las dos subunidades HIF-1 α y HIF-2 α . Como se muestra en la figura 6, el tratamiento de las células con R59949 no tenía ningún efecto sobre los niveles de mRNA pese a observarse en las mismas células una inhibición total de la proteína. En el caso de las células 786-O se observa una ligera bajada en las células tratadas con R59949 del mensajero de HIF-2 α , pero creemos que justifican la bajada de la proteína. En algún caso esas ligeras variaciones se observan al alza, como en 293-T. Después de esto nos planteamos el analizar si la ruta del proteosoma/VHL estaba implicada en el efecto del R59949. Decidimos utilizar el sistema de células deficientes en VHL. El tratamiento de estas células con el agente farmacológico no tenía ningún efecto sobre los niveles de proteína, tanto α 1 como α 2, que se encuentran constitutivamente estabilizados en estas líneas. Por lo tanto R59949 requiere de la presencia de VHL para ejercer su efecto negativo sobre HIF. En todos los casos la internalización y el efecto inhibitorio del agente se controlaron confirmando que era capaz de inhibir la acumulación de PA inducida por hipoxia en estas células. Estos datos sugieren que el mecanismo de acción del inhibidor requiere que el sistema de degradación de HIF esté intacto. Aunque no hay nada descrito al respecto, nos planteamos si el inhibidor pudiera estar modificando los niveles de la proteína VHL, aumentándolos e incrementando por lo tanto la tasa de

degradación de HIF. Se determinó en dos tipos celulares que esto no estaba sucediendo, los niveles de VHL se mantienen por igual en todos los tratamientos.

Otra posible manera de regular los niveles de HIF y su interacción con VHL de manera independiente de hidroxilación, es por la regulación de sus niveles de acetilación. Se ha descrito que la acetiltransferasa ARD-1 acetila a HIF en normoxia promoviendo su interacción con VHL. En hipoxia el mRNA de esta proteína disminuye y por lo tanto su actividad, de manera que la acetilación de HIF disminuye, no interacciona de esa manera con VHL y se estabiliza. Nosotros como se muestra en la figura no hemos sido capaces de reproducir esos datos. No observamos disminución del mRNA de la acetiltransferasa en hipoxia ni en 293-T ni en otros dos tipos celulares. Puede que el fenómeno de la acetilación sea específico de tipo celular, ya que en el artículo en el que lo describen lo analizan sólo en una determinada línea celular.

2. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL AGENTE R59949 SOBRE LAS HIDROXILASAS DE HIF.

Dado que las PHDs son las principales reguladoras de la estabilización de HIF en hipoxia, nos planteamos si este agente pudiese estar aumentando la unión de VHL a HIF, así como la actividad prolina hidroxilasa. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con R59949 tiene un efecto sobre la actividad PHD, aumentado su actividad y favoreciendo por lo tanto la hidroxilación de HIF y su unión a VHL. El efecto activador sobre las PHDs lo observamos ya en condiciones de normoxia 21%, lo que explica la inhibición que se observa con este agente de los niveles basales de HIF que a veces presentan las células ya en normoxia. En algunas condiciones de cultivo como una confluencia más alta, la estimulación con factores de crecimiento, citoquinas, se ha descrito que estabilizan a HIF, sería interesante estudiar si el agente farmacológico tiene un efecto inhibitorio sobre estos estímulos.

Encontramos que R59949 inhibía la transcripción dependiente de HIF que se encuentra constitutivamente activada en células VHL negativas. El hecho de que en estas células el compuesto sea capaz de inhibir la actividad transcripcional de HIF sin afectar a la estabilización de la proteína sugiere que R59949 está también regulando los mecanismos que controlan la actividad transcripcional de HIF y por lo tanto, sugiere que FIH pudiera estar siendo activado en esas células. Sin embargo habría que realizar más experimentos para estudiar mejor esta posibilidad.

Una vez determinado el papel activador de R59949 sobre las hidroxilasas de HIF, será necesario plantear nuevos experimentos para determinar la diana directa sobre la que estaría actuando el R59949. Por una parte, como el oxígeno molecular es uno de los sustratos de las hidroxilasas de HIF, tanto de las PHDs como de FIH, una posibilidad sería que el R59949 estuviera

umentando la afinidad por el oxígeno de las hidroxilasas. Bajo tensiones de oxígeno muy bajas ($1\%O_2$), cuando la actividad de estas enzimas se ve reducida por la baja disponibilidad de sustrato, este agente podría estar aumentando su habilidad para unir O_2 y por lo tanto aumentar la hidroxilación de HIF y su degradación. En este sentido, las hidroxilasas de colágeno son efectamente activas a esas concentraciones de O_2 , lo que indica que pese a estar limitante, el oxígeno está siendo accesible a actividades enzimáticas similares. Puede que el compuesto esté modificando alostéricamente a la enzima permitiendo una mayor afinidad por el gas. Por otro lado, se ha descrito recientemente que inhibidores de la respiración mitocondrial, así como el óxido nítrico, son capaces de redistribuir el O_2 intracelular, aumentando así su disponibilidad en las zonas donde se encuentran las PSD (Hagen et al., 2003). En este sentido, R59949 podría también estar reduciendo una relocalización del oxígeno, hacia las zonas donde se encuentran las hidroxilasas de HIF.

A parte del oxígeno molecular, la reacción de hidroxilación requiere la presencia de ácido ascórbico como cofactor, para mantener los niveles de FeII, ya que la reacción de hidroxilación oxida el FeII a FeIII quedando la enzima inactiva. El ascórbico reduce FeIII a FeII reactivando la enzima. Se ha determinado que la inhibición de las prolina hidroxilasas producida por los metales de transición Níquel y Cobalto se debe (sin descartar su posible papel también sustituyendo al hierro en el sitio activo) a la bajada que producen en los niveles intracelulares de ascorbato. En ese sentido hay un trabajo (Knowles et al., 2003) en el que muestran que ciertos estímulos como algunas transformaciones oncogénicas, que producen acúmulos de HIF, se debe a que el ascorbato está limitante en algunas condiciones de cultivo y por tanto las PHDs se encuentran inhibidas. En esas condiciones, la suplementación con hierro o ascórbico restaura la actividad enzimática, por lo tanto un posible efecto del R59949 pudiera ser la regulación de la disponibilidad intracelular del ácido ascórbico o de ión ferroso. Finalmente en un reciente artículo (Gerald et al., 2004), se ha propuesto el papel de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en células JunD negativas sobre la actividad hidroxilasa. El aumento de ROS en estas células promueve la oxidación del hierro (II) en hierro (III) por la reacción de Fenton y por lo tanto aumenta la proporción de PHDs inactivas, en estado de hierro (III). De acuerdo con estos datos, no excluimos la posibilidad de que el R59949 esté afectando a los niveles de ROS y modulando de esta manera u otra de las propuestas como mecanismo de acción de los ROS sobre HIF, a las hidroxilasas de HIF. En este sentido, se ha visto que R59022, un análogo más inactivo que el R59949, potencia la producción de ROS en leucocitos polimorfonucleares (Ohtsuka et al., 1990).

Hemos descrito previamente que la hipoxia produce un aumento de PA levels paralelo a la acumulación de HIF. Ambos, tanto la acumulación como la activación de HIF inducidos por hipoxia se inhiben tras el tratamiento con R59949. Este compuesto ha sido caracterizado como un

inhibidor específico de las diacilglicerol quinasas de tipo I y por lo tanto propusimos un posible papel de estas enzimas en la regulación de HIF en la hipoxia. En el presente trabajo, proponemos al R59949 como un nuevo activador de HIF-hidroxilasas. Cuando realizamos los mismos experimentos usando el inhibidor previamente descrito de SMS/PC-PLC D609, encontramos que este agente también inducía la formación de complejos VHL-HIF. Considerando que D609 también inhibe la acumulación de PA en hipoxia, sugiere un posible papel del PA en la regulación de la interacción VHL-HIF. En este sentido, la acumulación de PA tras la exposición a hipoxia estaría inhibiendo la actividad HIF-hidroxilasa y contribuyendo a la activación de HIF. Como el PA es un segundo mensajero que se induce en respuesta a diferentes estímulos, la posible regulación de HIF-hidroxilasas por PA podría ser un campo de investigación en cuanto a que HIF se induce por otros estímulos diferentes de la hipoxia, como factores de crecimiento, estimulación por citoquinas....

El PA podría mediar esta supuesta regulación de varias formas. Por un lado podría tener lugar una regulación por interacción física directa entre el PA y las hidroxilasas, con lo que se favorecería una determinada localización subcelular de las PHDs que afectase a su actividad. Por otra parte, podría tener lugar una regulación indirecta, mediada por los distintos efectores de PA mencionados anteriormente, que podrían fosforilar o modificar las PHDs de forma que se afectase a su capacidad de hidroxilación.

Sin embargo los resultados obtenidos en este trabajo no nos permiten descartar un efecto directo del R59949 sobre HIF-hidroxilasas. Incluso el hecho de que el D609 tenga efectos similares no excluye esta posibilidad, ya que aunque su estructura molecular no sea parecida aparentemente, no sabemos cuáles son los putativos requerimientos estructurales para producir el efecto. Próximos experimentos en el laboratorio están conducidos a clarificar este punto, estudiando el efecto de ambos inhibidores al ser añadidos *in vitro* a la reacción de hidroxilación.

Para aclarar si el efecto es mediado por la modulación de los niveles de PA, sería interesante plantear experimentos en un futuro añadiendo exógenamente a las células diferentes ácidos fosfatídicos y observando su efecto sobre HIF. Estos experimentos tienen la limitación técnica de que la señalización por PA (y en general por los segundos mensajeros lipídicos) es totalmente dependiente de la localización subcelular donde se está produciendo el lípido, así como del lípido concreto en cuestión que se está generando.

El uso de este inhibidor es el único abordaje experimental que existe actualmente para interferir en la actividad DGK. En la actualidad se han clonado nueve isoformas diferentes de DGKs en mamíferos. El R59949 se ha descrito como específico de las de tipo I, y algunos autores han descrito que el R59949 no afecta a la actividad DGK ζ , pero el efecto del compuesto sobre todas las isoformas no se ha caracterizado todavía. Ya que la activación del programa génico dependiente de HIF ha sido detectado en todas las células analizadas es posible especular que una isoforma o

isoformas concretas esté implicada en la activación de HIF o que cada tipo celular utilice su repertorio de isoformas de la DGK para generar PA en respuesta a hipoxia. Cada una de las isoformas de DGK presentes en la célula presenta una distribución subcelular característica lo cual plantea la posibilidad de que la acumulación de PA en hipoxia se produzca en compartimentos subcelulares concretos. Este concepto ha sido evidenciado en el caso del DGK ζ (Topham 1998). Se ha descrito previamente que la localización subcelular de las distintas isoformas de DGK es específica y esencial para desempeñar sus funciones celulares (Goto and Kondo, 1999). De este modo, sería interesante estudiar en un futuro si la hipoxia promueve la relocalización subcelular de ciertas isoformas de DGK. La identificación de las isoformas expresadas en cada tipo celular será un requisito previo al inicio de un análisis genético con el empleo de RNAs de interferencia. Además, se requerirá la generación de versiones con pérdida de función de las DGKs detectadas en cada tipo celular y la comprobación de que realmente funcionan como dominantes negativos en cada tipo celular. Hasta la fecha, entre las nueve isoformas de DGK sólo hay un artículo que propone una versión dominante negativa de DGK α , que aún no ha sido confirmada por otros autores (Cutrupi et al., 2000).

En los últimos años HIF-1 α y HIF-2 α han sido implicados como factores críticos en la progresión tumoral así como en la angiogénesis patológica. La expresión de HIF promueve la supervivencia de las células que se encuentran en un microambiente hipóxico en tumores, aumentando la expresión de proteínas que median la adaptación a un metabolismo anaeróbico (Glut-1, LDH), resistencia a la apoptosis (TGF- α , NOS-2), angiogénesis (VEGF, TGF- β 3, EGFR2) y la invasión y la metástasis (c-MET, UPAR). Además, las células cancerígenas en situación de hipoxia son más resistentes a la radiación y a la quimioterapia. Por lo tanto, la inhibición de HIF sería una buena aproximación terapéutica contra estas situaciones. Como las PSD y FIH son las responsables de la regulación de HIF, las nuevas terapias dirigidas contra HIF se están focalizando en la regulación de la actividad hidroxilasa. En este sentido, nuestros resultados muestran que el R59949 tiene un efecto estimulador de estas enzimas, lo que indica un posible uso de este inhibidor como agente terapéutico contra el cáncer. Una de las ventajas de este compuesto sería que es capaz de inhibir con la misma eficacia la estabilización de HIF-1 α y HIF-2 α , y por lo tanto ofrece la posibilidad de su uso en diferentes tipos celulares, independientemente de la isoforma que se exprese mayoritariamente en cada célula. Además, este compuesto parece estimular la actividad de las PHDs así como la actividad de FIH y por lo tanto podría regular tanto la estabilización de HIF así como su activación transcripcional. Esto es de crítica importancia en el caso de tumores deficientes en VHL, en los que las moléculas de HIF escapan de la degradación regulada por las PSD, por lo tanto la única aproximación terapéutica en estas células sería la inhibición de la activación transcripcional de HIF. En nuestro trabajo mostramos que R59959

bloquea la transcripción dependiente de HIF en 786-O-1-115, por lo que podemos proponer el uso de este inhibidor para el tratamiento de este tipo de tumores altamente agresivos. R59949 también podría ser utilizado en el tratamiento de la retinopatía diabética y de la hipertensión pulmonar, patologías que se caracterizan por la alta expresión de HIF. En cualquier caso, es necesario contrastar los datos observados *in vitro* con experimentos *in vivo*, para validar el diseño de terapias basadas o apoyadas en el uso de R59949.

En conclusión, nuestros datos abren una nueva área de investigación alrededor de la activación de las hidroxilasas de HIF, que junto con el estudio de su inhibición, permitan caracterizar el mecanismo de regulación de estas enzimas. La profundización en el conocimiento de la regulación y funcionamiento de estas enzimas es de gran interés no sólo por lo relacionado con la inducción en hipoxia de HIF, sino por su implicación en otros procesos fisiopatológicos en los que HIF está implicado como la inflamación, la activación por oncogenes o la respuesta a factores de crecimiento.

CONCLUSIONES

La realización de este trabajo de Tesis, de acuerdo con los resultados previamente presentados, permite extraer las siguientes conclusiones:

1. La inhibición de la acumulación de las dos isoformas de HIF en hipoxia, HIF-1 α y HIF-2 α , en presencia del agente farmacológico R59949 se produce sin afectar a los niveles de mRNA de ambas isoformas.
2. La presencia de la proteína VHL es necesaria para el efecto inhibitorio de los agentes farmacológicos R59949 y D609. Pero este efecto no puede ser explicado por modificaciones en los niveles de la proteína VHL.
3. El efecto farmacológico del inhibidor de la inducción de HIF se debe a que este agente R59949 tiene un efecto directo activando la actividad prolina hidroxilasa y favoreciendo por tanto la interacción HIF-VHL y la degradación posterior de HIF vía proteosoma.
4. La actividad transcripcional dependiente de HIF es inhibida por el tratamiento con este agente. Sugiere que la actividad asparaginil hidroxilasa puede ser aumentada por este agente.

BIBLIOGRAFÍA

- Acker T, Acker H** (2004): Cellular oxygen sensing need in CNS: physiological and pathological implications. *J Exp Biol* 207:3171-3188.
- Alfranca A, Gutierrez MD, Vara A, Aragonés J, Vidal F, Landazuri MO** (2002): c-Jun and Hypoxia-Inducible Factor 1 Functionally Cooperate in Hypoxia- Induced Gene Transcription. *Mol Cell Biol* 22:12-22.
- Alvarez-Tejado M, Naranjo-Suarez S, Jimenez C, Carrera AC, Landazuri MO, del Peso L** (2001): Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway in PC12 cells: protective role in apoptosis. *J Biol Chem* 276:22368-74.
- Andresen BT, Rizzo MA, Shome K, Romero G** (2002): The role of phosphatidic acid in the regulation of the Ras/MEK/Erk signaling cascade. *FEBS Lett.* 531:65-8.
- Aragones J, Jones DR, Martin S, San Juan MA, Alfranca A, Vidal F, Vara A, Merida I, Landazuri MO** (2001): Evidence for the involvement of diacylglycerol kinase in the activation of hypoxia-inducible transcription factor 1 by low oxygen tension. *J Biol Chem* 276:10548-55.
- Ausserer WA, Bourrat-Floek B, Green CJ, Laderoute KR, Sutherland RM** (1994): Regulation of c-jun expression during hypoxic and low-glucose stress. *Mol Cell Biol* 14:5032-42.
- Bandyopadhyay RS, Phelan M, Faller DV** (1995): Hypoxia induces AP-1-regulated genes and AP-1 transcription factor binding in human endothelial and other cell types. *Biochim Biophys Acta* 1264:72-8.
- Beitner-Johnson D, Millhorn DE** (1998): Hypoxia induces phosphorylation of the cyclic AMP response element- binding protein by a novel signaling mechanism. *J Biol Chem* 273:19834-9.
- Beitner-Johnson D, Rust RT, Hsieh T, Millhorn DE** (2000): Regulation of CREB by moderate hypoxia in PC12 cells. *Adv Exp Med Biol* 475:143-52.
- Beitner-Johnson D, Rust RT, Hsieh TC, Millhorn DE** (2001): Hypoxia activates Akt and induces phosphorylation of GSK-3 in PC12 cells. *Cellular Signalling* 13:23-7.
- Bergers G, Benjamin EL** (2003): Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews* 3:401-10.
- Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J** (2003): HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J.* 22:4082-90.
- Berra E, Roux D, Richard DE, Pouyssegur J** (2001): Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) escapes O(2)-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization: nucleus or cytoplasm. *EMBO Rep* 2:615-20.
- Bligh E, Dyer W** (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-7.
- Bruick RK** (2003): Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes Dev* 17:2614-23.
- Bruick RK, McKnight SL** (2001): A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294:1337-40.

Junn HF, Poyton RO (1996): Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev* 6:839-85.

Armeliot P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshet E, Keshet E (1998): Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis (published erratum appears in *Nature* 1998 Oct 1;395(6701):525]. *Nature* 394:485-90.

Barrière A, Carmona MC, Fernandez Y, Rigoulet M, Wenger RH, Penicaud L, Casteilla L (2004): Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 279: 40462-40469.

Bhan DA, Sutphin PD, Denko NC, Giaccia AJ (2002): Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem.*277: 40112-7.

Bhandel NS (1997): Cellular respiration during hypoxia. Role of cytochrome oxidase as the oxygen sensor in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 272:18808-16.

Bhandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT (1998): Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11715-20.

Bhen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A (2001): Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 276:9519-25.

Bihab R, Ferry C, Koziel V, Monin P, Daval JL (1998): Sequential activation of activator protein-1-related transcription factors and JNK protein kinases may contribute to apoptotic death induced by transient hypoxia in developing brain neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 63:105-20.

Bhun YS, Kim MS, Park JW (2002): Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1alpha. *J Korean Med Sci* 17:581-8.

Bonforti L, Millhorn DE (1997): Selective inhibition of a slow-inactivating voltage-dependent Ca^{2+} channel in rat PC12 cells by hypoxia. *J Physiol (Lond)* 502:293-305.

Bonrad PW, Freeman TL, Beitner-Johnson D, Millhorn DE (1999a): EPAS1 trans-activation during hypoxia requires p42/p44 MAPK. *J Biol Chem* 274:33709-13.

Bonrad PW, Millhorn DE, Beitner-Johnson D (2000): Hypoxia differentially regulates the mitogen- and stress-activated protein kinases. Role of Ca^{2+} /CaM in the activation of MAPK and p38 gamma. *Adv Exp Med Biol* 475:293-302.

Bonrad PW, Rust RT, Han J, Millhorn DE, Beitner-Johnson D (1999b): Selective activation of p38alpha and p38gamma by hypoxia. Role in regulation of cyclin d1 by hypoxia in PC12 cells. *J Biol Chem* 274:23570-6.

Buevas Y, Hernandez-Alcoceba R, Aragonés J, Naranjo-Suarez S, Castellanos Maria C, Esteban MA, Martín S, Landazuri MO, del Peso L (2003): Specific oncolytic effect of a new HIF-dependent replicative adenovirus on VHL-defective renal cell carcinomas. *Cancer Res* 63, 877-84.

Cutrupi S, Baldanzi G, Gramaglia D, Maffe A, Schaap D, Giraudo E, van Blitterswijk W, Bussolino F, Comoglio PM, Graziani A (2000): Src-mediated activation of alpha-diacylglycerol kinase is required for hepatocyte growth factor-induced cell motility. *EMBO J.* 19:4614-22.

Czyzyk-Krzeska MF, Bayliss DA, Lawson EE, Millhorn DE (1992): Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the rat carotid body by hypoxia. *J Neurochem* 58:1538-46.

Czyzyk-Krzeska MF, Furnari BA, Lawson EE, Millhorn DE (1994): Hypoxia increases rate of transcription and stability of tyrosine hydroxylase mRNA in pheochromocytoma (PC12) cells. *J Biol Chem* 269:760-4.

James SA, Martinez-Yamout M, De Guzman RN, Dyson HJ, Wright PE (2002): Structural basis for Hif-1 alpha /CBP recognition in the cellular hypoxic response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5271-6.

del Peso L, Castellanos MC, Temes E, Martin-Puig S, Cuevas Y, Olmos G, Landazuri MO (2003): The von Hippel Lindau/Hypoxia-inducible Factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-Proline Hydroxylase genes in response to low oxygen. *J Biol Chem* 278:48690-95.

Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z, Schumacker PT (1998): Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 273:11619-24.

Ebert BL, Bunn HF (1998): Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. *Mol Cell Biol* 18:4089-96.

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2001): C. elegans EGL-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxygenases that Regulate HIF by Prolyl hydroxylation. *Cell* 107:43-54.

Exton JH (1997): Phospholipase D: enzymology, mechanisms of regulation, and function. *Physiol Rev* 77:303-20.

Frederick J, Frede S, Jelkmann W (1994): Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production. *Biochem J* 303:507-10.

Guo Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A, Chen J (2001): Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 294:1942-5.

Hirth JD, Ebert BL, Pugh CW, Ratcliffe PJ (1994): Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6496-500.

Hirth JD, Ebert BL, Ratcliffe PJ (1995): Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J Biol Chem* 270:21021-7.

Frederickman SJ, Sun ZY, Poy F, Kung AL, Livingston DM, Wagner G, Eck MJ (2002): Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5367-72.

- Fukami K, Takenawa T** (1992): Phosphatidic acid that accumulates in platelet-derived growth factor-stimulated Balb/c 3T3 cells is a potential mitogenic signal. *J. Biol. Chem.* 267:10988-93.
- Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza G** (2002): Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* 277:38205-211.
- Gassmann M, Kvietikova I, Rolfs A, Wenger RH** (1997): Oxygen- and dioxin-regulated gene expression in mouse hepatoma cells. *Kidney Int* 51:567-74.
- Gerald D, Berra E, Frapart YM, Chan DA, Giaccia AJ, Mansuy D, Pouyssegur J, Yaniv M, Mechta-Grigoriou F** (2004): JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell.* 2004 Sep 17;118(6):781-94.
- Ghosh S, Moore S, Bell RM, Dush M** (2003): Functional analysis of a phosphatidic acid binding domain in human Raf-1 kinase : Mutations in the phosphatidate binding domain lead to tail and trunk abnormalities in developing zebrafish embryos. *J Biol Chem* 278:45690-96.
- Gleadle JM, Ebert BL, Ratcliffe PJ** (1995): Diphenylene iodonium inhibits the induction of erythropoietin and other mammalian genes by hypoxia. Implications for the mechanism of oxygen sensing. *Eur J Biochem* 234:92-9.
- Goldberg M, Zhang HL, Steinberg SF** (1997): Hypoxia alters the subcellular distribution of protein kinase C isoforms in neonatal rat ventricular myocytes. *J Clin Invest* 99:55-61.
- Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF** (1988): Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 242:1412-5.
- Gorlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, Berchner-Pfannschmidt U, Roth U, Brandes RP, Gietzmann T, Busse R** (2001): Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells. Role of the p22phox-containing NADPH oxydase. *Circulation Res.* 89:47-54.
- Goto K, Kondo H** (1999): Diacylglycerol kinase in the central nervous system--molecular heterogeneity and gene expression. *Chem Phys Lipids* 98:109-17.
- Gozal E, Simakajornboon N, Dausman JD, Xue YD, Corti M, El-Dahr SS, Gozal D** (1999): Hypoxia induces selective SAPK/JNK-2-AP-1 pathway activation in the nucleus tractus solitarius of the conscious rat. *J Neurochem* 73:665-74.
- Gozal E, Simakajornboon N, Gozal D** (1998): NF-kappaB induction during in vivo hypoxia in dorsocaudal brain stem of rat: effect of MK-801 and L-NAME. *J Appl Physiol* 85:372-6.
- Ju YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA** (1998): Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr.* 7:205-13.
- Lysenbergh A, Zakaroff-Girard A, Loufoua J, Meunier L, Andre-Fouet X, Lagarde M, Trigant AF, Ovize M** (2000): Brief preconditioning ischemia alters diacylglycerol content and composition in rabbit heart. *Basic Res Cardiol* 95:457-65.
- Lagen T, Taylor CT, Lam F, Moncada S** (2003): Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF-1 α . *Science* 302:1975-78.

- Leidbreder M, Frohlich F, Jöhren O, Dendorfer A, Qadri F, Dominiak P** (2003): Hypoxia rapidly activates HIF-3 α mRNA expression. *FASEB J* 17:1541-3.
- Lewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM, Oldham NJ, Bhattacharya S, Gleadle JM, Ratcliffe PJ, Pugh CW, Schofield CJ** (2002): Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem* 277:26351-5.
- Liotta K, Semenza GL** (2001): Rac1 activity is required for the activation of hypoxia-inducible factor-1. *J. Biol. Chem.* 276:21166-72.
- Lo VT, Bunn HF** (1996): Effects of transition metals on the expression of the erythropoietin gene: further evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Biochem Biophys Res Commun* 223:175-80.
- Lodgkin MN, Pettitt TR, Martin A, Michell RH, Pemberton AJ, Wakelam MJ** (1998): Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers? *Trends Biochem Sci* 23:200-4.
- Lofbauer KH, Gess B, Lohaus C, Meyer HE, Katschinski D, Kurtz A** (2003): Oxygen tension regulates the expression of a group of procollagen hydroxylases. *Eur J Biochem* 270:4515-22.
- Luang J, Zhao Q, Mooney SM, Lee FS** (2002): Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1 α for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J. Biol. Chem.* 277:39792-800.
- Luang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF** (1996): Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit. *J Biol Chem* 271:32253-9.
- Luang LE, Bunn HF** (2003): Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance. *J Biol Chem.* 278:19575-8.
- Luang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF** (1998): Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂- dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7987-92.
- Luang LE, Willmore WG, Gu J, Goldberg MA, Bunn HF** (1999): Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling. *J Biol Chem* 274:9038-44.
- Ludson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT** (2002): Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Biol Cell* 22:7004-14.
- Liopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG** (1995): Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat. Med.* 1:822-6.
- Maes JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, Neckers LM** (2002): Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 α -degradative pathway. *J Biol Chem* 277:29936-44.

to J, Nagayasu Y, Ueno S, Yokoyama S (2002): Apolipoprotein-mediated cellular lipid release requires replenishment of sphingomyelin in a phosphatidylcholine-specific phospholipase C-dependent manner. *J Biol Chem* 277:44709-14.

van M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin NG, Jr. (2001): HIF-1 α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292:464-8.

vanov SV, Kuzmin I, Wey MH, Pack S, Geil L, Johnson BE, Stanbridge EJ, Lerman MI (1998): Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 95:12596-601.

Wyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL (1998): Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev* 12:149-62.

Wuolikola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001): Targeting of HIF-1 α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292:468-72.

Uelkmann W (1992): Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 72:449-89.

Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim CW (2002): Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111(5):709-20.

Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M (2001): Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 15:1312-4.

Liang BH, Agani F, Passaniti A, Semenza GL (1997): V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res* 57:5328-35.

Liang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL (1996a): Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271:17771-8.

Liang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH (1996b): Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 271:C1172-80.

Liang Y, Sakane F, Kanoh H, Walsh JP (2000): Selectivity of the diacylglycerol kinase inhibitor-2-(4-[bis-(4-fluorophenyl)methylene]-1-piperidiethyl)-2,3-dihydro-2-thioxo-4(1H)quinazolinone R59949) among diacylglycerol kinase subtypes. *Biochem Pharmacol* 59:763-72.

Lung F, Haendeler J, Hoffmann J, Reissner A, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S (2002): Hypoxic induction of the hypoxia-inducible factor is mediated via the adaptor protein Shc in endothelial cells. *Circ Res* 91:38-45.

Lung Y, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Liu ZG, Neckers L (2003a): Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor kappa B activation. *Biochem J* 370:1011-7.

Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L (2003b): IL-1 β -mediated up-regulation of HIF-1 α via an NF κ B/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J* 17:2115-7.

Kaelin WG (2002): Molecular basis of the VHL hereditary syndrome. *Nat Rev Cancer* 2:673-682.

Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L (1998): Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *EMBO J* 17:6573-86.

Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, Conaway JW (2000): Activation of HIF-1 α ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10430-10435.

Kietzmann T, Porwol T, Zierold K, Jungermann K, Acker H (1998): Involvement of a local Fenton reaction in the reciprocal modulation by O₂ of the glucagon-dependent activation of the phosphoenolpyruvate carboxikinase gene and the insulin-dependent activation of the glucokinase gene in rat hepatocytes. *Biochem J* 335:425-32.

Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K, Ogura T, D'Acquisto F, Addeo R, Makuuchi M, Esumi H (2000): Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 95:189-97.

Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, Semenza GL (1999): Defective vascularization of HIF-1 α -null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol* 209:254-67.

Kozawa O, Suzuki A, Kaida T, Tokuda H, Uematsu T (1997): Tumor necrosis factor- α autoregulates interleukin-6 synthesis via activation of protein kinase C. Function of sphingosine 1-phosphate and phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *J Biol Chem* 272:25099-104.

Kuznetsova AV, Meller J, Schnell PO, Nash JA, Ignacak M, Sánchez Y, Conaway J, Conaway R, Czyzyk-Krzeska MF (2003): von Hippel-Lindau protein binds hyperphosphorylated large subunit of RNA polymerase II through a proline hydroxylation motif and targets it for ubiquitination. *PNAS* 100: 2706-2711.

Łulisz A, Chen N, Chandel NS, Shao Z, Schumacker PT (2002): Mitochondrial ROS initiate phosphorylation of p38 MAP kinase during hypoxia in cardiomyocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:1324-1329.

Laderoute KR, Mendonca HL, Calaoagan JM, Knapp AM, Giaccia AJ, Stork PJ (1999): Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression is induced by low oxygen conditions found in solid tumor microenvironments. A candidate MKP for the inactivation of hypoxia-inducible stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal protein kinase activity. *J Biol Chem* 274:12890-7.

Land O, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, White MF, Bruick RK (2002a): FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 16:1466-71.

Land O, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML (2002b): Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: a hypoxic switch. *Science* 295:858-61.

- Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW (2004): Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 36:1-12.
- Lelkes PI, Hahn KL, Sukovich DA, Karmiol S, Schmidt DH (1998): On the possible role of reactive oxygen species in angiogenesis. *Adv Exp Med Biol* 454:295-310.
- Lipscomb EA, Sarmiere PD, Freeman RS (2001): SM-20 is a novel mitochondrial protein that causes caspase-dependent cell death in nerve growth factor-dependent neurons. *J Biol Chem* 276:5085-92.
- Liu Y, Christou H, Morita T, Laughner E, Semenza GL, Kourembanas S (1998): Carbon monoxide and nitric oxide suppress the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene via the 5' enhancer. *J Biol Chem* 273:15257-62.
- Lopez-Barneo J, Ortega-Saenz P, Molina A, Franco-Obregón A, Urena J, Castellano A (1997): Oxygen sensing by ion channels. *Kidney Int* 51:454-61.
- Lopez-Barneo J, Pardal R, Montoro RJ, Smani T, Garcia-Hirschfeld J, Urena J (1999): K⁺ and Ca²⁺ channel activity and cytosolic [Ca²⁺] in oxygen-sensing tissues. *Respir Physiol* 115:215-27.
- Luberto C, Hannun YA (1998): Sphingomyelin synthase, a potential regulator of intracellular levels of ceramide and diacylglycerol during SV40 transformation. Does sphingomyelin synthase account for the putative phosphatidylcholine-specific phospholipase C? *J Biol Chem* 273:14550-9.
- Mabjeesh NJ, Post DE, Willard MT, Kaur B, Van Meir EG, Simons JW, Zhong H (2002): Geldanamycin induces degradation of hypoxia-inducible factor 1 α protein via the proteasome pathway in prostate cancer cells. *Cancer Res* 62:2478-82.
- Maija. Hirsila, Peppi. Koivunen, Volkmar Gn, Kari. I. Kivirikko, Myllyharju J (2003): Characterization of the Human Prolyl 4-Hydroxylases That Modify the Hypoxia-inducible Factor. *J Biol Chem* 278:30772-80.
- Majamaa K, Gunzler V, Hanauske-Abel HM, Myllyla R, Kivirikko KI (1986): Partial identity of the 2-oxoglutarate and ascorbate binding sites of prolyl 4-hydroxylase. *J Biol Chem* 261:7819-23.
- Manifava M, Thuring JW, Lim ZY, Packman L, Holmes AB, Ktistakis NT (2001): Differential binding of traffic-related proteins to phosphatidic acid- or phosphatidylinositol (4,5)- bisphosphate-coupled affinity reagents. *J Biol Chem* 276:8987-94.
- Martin-Puig S, Temes E, Olmos G, Jones DR, Aragonés J, Landazuri MO (2004): Role of Iron (II)-2-oxoglutarate-dependent dioxygenases in the generation of hypoxia-induced phosphatidic acid through HIF-1/2 and von Hippel-Lindau-independent mechanisms. *J Biol Chem* 279:9504-11.
- Masson N, Ratcliffe PJ (2003): HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O₂ levels. *J Cell Sci* 116:3041-9.
- Mateo J, Garcia-Lecea M, Cadenas S, Hernandez C, Moncada S (2003): Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by nitric oxide through mitochondria-dependent and -independent pathways. *Biochem J* 376:537-44.
- Maxwell HP, Pugh CW, Ratcliffe P (2001): Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 11:293-9.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999): The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis [see comments]. *Nature* 399:271-5.

Mazure NM, Chen EY, Laderoute KR, Giaccia AJ (1997): Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras- transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood* 90:3322-31.

Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Burgel T, Jelkmann W, Acker H, Fandrey J (2003a): Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* 116:1319-26.

Metzen E, Jelkmann W, Fandrey J, Brune B (2003b): Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1 α by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell* 14:3470-81.

Minet E, Arnould T, Michel G, Roland I, Mottet D, Raes M, Remacle J, Michiels C (2000): ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett* 468:53-58.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991): Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-42.

Muller JM, Krauss B, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Rupec RA (1997): Hypoxia induces c-fos transcription via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 272:23435-9.

Muraoka K, Shimizu K, Sun X, Zhang YK, Tani T, Hashimoto T, Yagi M, Miyazaki I, Yamamoto K (1997): Hypoxia, but not reoxygenation, induces interleukin 6 gene expression through NF-kappa B activation. *Transplantation* 63:466-70.

Dhh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG (2000): Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* 2:423-427.

Okuda H, Saitoh K, Hirai S, Iwai K, Takaki Y, Baba M, Minato N, Ohmo S, Shuin T (2001): The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein mediates ubiquitination of activated atypical protein kinase C. *J Biol Chem* 276:43611-43617.

Page EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE (2002): Induction of hypoxia-inducible factor 1 alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem* 277:48403-09.

Palmer LA, Gaston B, Johns RA (2000): Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1 expression and activity: redox-dependent effect of nitrogen oxides. *Mol Pharmacol* 58:1197-203.

Pugh CW, Ratcliffe PJ (2003): Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9:677-84.

Savi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A (2000): Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 14:34-44.

Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J (1999): p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* 274:32631-7.

Richard DE, Berra E, Pouyssegur J (2000): Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275:26765-71.

Rizzo MA, Shome K, Vasudevan C, Stolz DB, Sung TC, Frohman MA, Watkins SC, Romero G (1999): Phospholipase D and its product, phosphatidic acid, mediate agonist-dependent raf-1 translocation to the plasma membrane and the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 274:1131-9.

Ryan HE, Lo J, Johnson RS (1998): HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 17:3005-15.

Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, Johnson RS (2000): Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 60:4010-5.

Safran M, Kaelin WGJ (2003): HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J Clin Invest* 111:779-83.

Sakane F, Kanoh H (1997): Molecules in focus: diacylglycerol kinase. *Int J Biochem Cell Biol* 29:1139-43.

Salceda S, Beck I, Srinivas V, Caro J (1997): Complex role of protein phosphorylation in gene activation by hypoxia. *Kidney Int* 51:556-9.

Sandau KB, Fandrey J, Brune B (2001a): Accumulation of HIF-1alpha under the influence of nitric oxide. *Blood* 97:1009-15.

Sandau KB, Faus HG, Brune B (2000): Induction of hypoxia-inducible-factor 1 by nitric oxide is mediated via the PI 3K pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 278:263-7.

Sandau KB, Zhou J, Kietzmann T, Brune B (2001b): Regulation of the hypoxia-inducible factor 1alpha by the inflammatory mediators nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in contrast to desferroxamine and phenylarsine oxide. *J Biol Chem* 276:39805-11.

Sanjuan MA, Jones DR, Izquierdo M, Merida I (2001): Role of diacylglycerol kinase alpha in the attenuation of receptor signaling. *J Cell Biol* 153:207-20.

Schmedtje JF, Jr., Ji YS, Liu WL, DuBois RN, Runge MS (1997): Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 272:601-8.

Schofield CJ, Ratcliffe P (2004): Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews* 5:343-54.

Scott PH, Paul A, Belham CM, Peacock AJ, Wadsworth RM, Gould GW, Welsh D, Plevin R (1998): Hypoxic stimulation of the stress-activated protein kinases in pulmonary artery fibroblasts. *Am J Respir Crit Care Med* 158:958-62.

Seko Y, Takahashi N, Tobe K, Kadowaki T, Yazaki Y (1997): Hypoxia and hypoxia/reoxygenation activate p65PAK, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), and stress-activated protein kinase (SAPK) in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 239:840-4.

Semenza G (2000a): HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev* 14:1983-91.

Semenza GL (2000b): Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35:71-103.

Semenza GL (2000c): Surviving ischemia: adaptative responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. *J Clin Invest* 106:809-12.

Semenza G (2001a): HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* 13:167-71.

Semenza G (2001b): Hypoxia-inducible factor1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *TRENDS Mol Med* 7:345-50.

Semenza GL (2001c): HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* 107:1-3.

Semenza G (2002): Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 64:993-8.

Semenza G (2003): Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews* 3:721-32.

Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, Giallongo A (1996): Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271:32529-37.

Beta KA, Spicer Z, Yuan Y, Lu G, Millhorn DE (2002): Responding to hypoxia: lessons from a model cell line. *Sci STKE* 146:RE11.

Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV (1997): c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 94:6658-63.

Shirai Y, Saito N (2002): Activation mechanisms of protein kinase C: maturation, catalytic activation, and targeting. *J Biochem* 132:663-8.

Sodhi A, Montaner S, Patel V, Zohar M, Bais C, Mesri EA, Gutkind JS (2000): The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha. *Cancer Res* 60:4873-80.

Sogawa K, Numayama-Tsuruta K, Ema M, Abe M, Abe H, Fujii-Kuriyama Y (1998): Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 95:7368-73.

Srinivas V, Leshchinsky I, Sang N, King MP, Minchenko A, Caro J (2001): Oxygen sensing and HIF-1 activation does not require an active mitochondrial respiratory chain electron-transfer pathway. *J Biol Chem* 276:21995-8.

Talke KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL (2000): The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 157:411-21.

- Temes E, Martin-Puig S, Aragonés J, Jones DR, Olmos G, Merida I, Landazuri MO** (2004): Role of diacylglycerol induced by hypoxia in the regulation of HIF-1 activity. *Biochem Biophys Res Commun* 315:44-50.
- Topham MK, Prescott SM** (1999): Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions. *J Biol Chem* 274:11447-50.
- van Blitterswijk WJ, Houssa B** (1999): Diacylglycerol kinases in signal transduction. *Chem Phys Lipids* 98:95-108.
- van Blitterswijk WJ, Houssa B** (2000): Properties and functions of diacylglycerol kinases. *Cell Signal* 12:595-605.
- Vaux EC, Metzen E, Yeates KM, Ratcliffe PJ** (2001): Regulation of hypoxia-inducible factor is preserved in the absence of a functioning mitochondrial respiratory chain. *Blood* 98:296-302.
- Wang F** (2002): HIF-1 α prolyl hydroxylase: molecular target of nitric oxide in the hypoxic signal transduction pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 295:657-62.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL** (1995a): Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 92:5510-4.
- Wang GL, Jiang BH, Semenza GL** (1995b): Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 216:669-75.
- Wang GL, Semenza GL** (1993a): Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem* 268:21513-8.
- Wang GL, Semenza GL** (1993b): Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 82:3610-5.
- Warnecke C, Griethe W, Weidemann A, Jurgensen JS, Willam C, Bachmann S, Ivashchenko Y, Wagner I, Frei U, Wiesener M, Eckardt KU** (2003): Activation of the hypoxia-inducible factor-pathway and stimulation of angiogenesis by application of prolyl hydroxylase inhibitors. *FASEB J.* 17:1186-8.
- Wenger RH** (2000): Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol* 203:1253-63.
- Wenger RH** (2002): Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J.* 16:1151-62.
- Wenger RH, Marti HH, Schuerer-Maly CC, Kvietikova I, Bauer C, Gassmann M, Maly FE** (1996): Hypoxic induction of gene expression in chronic granulomatous disease-derived B-cell lines: oxygen sensing is independent of the cytochrome b558-containing nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *Blood* 87:756-61.
- Williams SE, Wootton P, Mason HS, Bould J, Iles DE, Riccardi D, Peers C, Kemp PJ** (2004): Hemoxygenase-2 is an Oxygen Sensor for a Calcium-Sensitive Potassium Channel. *Science* Nov4; Epub ahead of print.

Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH (1998): Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *Blood* 92:2260-8.

Wood SM, Gleadle JM, Pugh CW, Hankinson O, Ratcliffe PJ (1996): The role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in hypoxic induction of gene expression. Studies in ARNT-deficient cells. *J Biol Chem* 271:15117-23.

Yan SF, Lu J, Zou YS, Kisiel W, Mackman N, Leitges M, Steinberg S, Pinsky D, Stern D (2000): Protein kinase C-beta and oxygen deprivation. A novel Egr-1-dependent pathway for fibrin deposition in hypoxemic vasculature. *J Biol Chem* 275:11921-8.

Yan SF, Lu J, Zou YS, Soh-Won J, Cohen DM, Buttrick PM, Cooper DR, Steinberg SF, Mackman N, Pinsky DJ, Stern DM (1999): Hypoxia-associated induction of early growth response-1 gene expression. *J Biol Chem* 274:15030-40.

Yin JH, Yang DI, Ku G, Hsu CY (2000): iNOS expression inhibits hypoxia-inducible factor-1 activity. *Biochem Biophys Res Commun* 279:30-4.

Yin T, Sandhu G, Wolfgang C, Burrier A, Webb R, Rigel D, Hai T, Whelan J (1997): Tissue-specific pattern of stress kinase activation in ischemic/reperfused heart and kidney. *J Biol Chem* 272:19943-50.

Yoshioka K, Clejan S, Fisher JW (1998): Activation of protein kinase C in human hepatocellular carcinoma (HEP3B) cells increases erythropoietin production. *Life Sci* 63:523-35.

Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, Semenza GL (2000): Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer* 88:2606-18.

Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B (1998): Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 α /ARNT. *EMBO J* 17:5085-94.

Zhang Z (2002): Crystal structure of clavamate synthase-Fe(II)-2-oxoglutarate-substrate-NO complex: evidence for metal centred rearrangements. *FEBS Lett* 517:7-12.

Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW (1999): Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 59:5830-5.

Zhou J, Schmid T, Brune B (2003): Tumor necrosis factor- α causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1 α through a nuclear factor- κ B-dependent pathway. *Mol Biol Cell* 14:2216-25.

Zhu H, Bunn HF (2001): Signal transduction. How do cells sense oxygen? *Science* 292:449-51.

Zundel W, Schindler C, Hass-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia A (2000): Loss of PTEN facilitates HIF-1 mediated gene expression. *Genes Dev* 14:391-6.

ANEXO I

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han publicado los siguientes artículos:

Juiss del Peso, Maria C. Castellanos, **Elisa Temes**, Silvia Martín-Puig, Yolanda Cuevas, Gemma Olmos and Manuel O. Landázuri. "The von Hippel Lindau/hypoxia inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen". *The Journal of Biological Chemistry*, 278 n° 49: 48690-48695. December 2003.

Elisa Temes, Silvia Martín-Puig, Gemma Olmos, David R. Jones, Julián Aragonés and Manuel O. Landázuri. "Role of iron (II)-2-oxoglutarate-dependent dioxygenases in the generation of hypoxia-induced phosphatidic acid through HIF-1/2 and VHL independent mechanisms". *The Journal of Biological Chemistry*, 279 n°10: 9504-9511. March 2004.

Elisa Temes, Silvia Martín-Puig, Julián Aragonés, David R. Jones, Gemma Olmos, Isabel Mérida and Manuel O. Landázuri. "Role of Diacylglycerol induced by hypoxia in the regulation of HIF-1 activity". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315: 44-50. January 2004.

Elisa Temes, Silvia Martín-Puig, Bárbara Acosta, María C. Castellanos, Julián Aragonés and Manuel O. Landázuri. "Pharmacological inhibition of HIFs through HIF-hydroxylases stimulation"
Manuscrito en preparación.

von Hippel Lindau/Hypoxia-inducible Factor (HIF) Pathway Regulates the Transcription of the HIF-Proline Hydroxylase Genes in Response to Low Oxygen*

Received for publication, August 11, 2003, and in revised form, September 22, 2003
Published, JBC Papers in Press, September 23, 2003, DOI 10.1074/jbc.M308862200

Luis del Peso^{‡§¶}, María C. Castellanos^{§¶*}, Elisa Temes[§], Silvia Martín-Puig[§], Yolanda Cuevas[‡],
Gemma Olmos[§], and Manuel O. Landázuri[§]

From the [‡]Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Arzobispo Morcillo
s/n, 28029 Madrid, Spain and [§]Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid,
Diego de León 62, 28006 Madrid, Spain

of the genes induced by hypoxia are regulated by
of transcription factors termed hypoxia-induc-
tors (HIF). Under normoxic conditions, HIF α
is very unstable due to hydroxylation by a
y described family of proline hydroxylases
EGL-Nine homologs (EGLN). Upon hydroxyla-
HIF α is recognized by the product of the tumor
suppressor *vhl* and targeted for proteosomal degrada-
tion. EGLNs require oxygen to catalyze HIF hy-
droxylation, this reaction does not efficiently occur un-
der oxygen tension. Thus, under hypoxia, HIF α
is spared from degradation and transcribes target genes.
EGLN levels of two of the three EGLNs described to
be induced by hypoxia, suggesting that they might
be HIF target genes; however, no proof for this
thesis has been reported. Here we show that the
induction of EGLN1 and -3 by hypoxia is found in a wide
array of cell types. The basal levels of EGLN3 are always
lower than those of EGLN1 and EGLN2, and its induc-
tion by hypoxia is larger than that found for EGLN1. The
overexpression of transcription, actinomycin D, prevents the
induction of EGLN3 mRNA induced by hypoxia, indicat-
ing that it is due to enhanced gene expression. Interest-
ingly, EGLN1 and EGLN3 mRNAs were also triggered by
growth inhibitors, suggesting the involvement of HIF α in
control of its transcription. In agreement with this
hypothesis, pVHL-deficient cell lines, which present
HIF activity under normoxia, also showed dramat-
ically increased normoxic levels of EGLN3. Moreover,
overexpression of an oxygen-insensitive mutant
HIF α resulted in increased normoxic levels of
EGLN3 mRNA. Finally, hypoxic induction of EGLN3 was
abolished in cells lacking functional HIF α .

molecules has been found to be altered in response to changes
in oxygen tension, including ion channels (1), kinases (2–7),
and transcription factors (2, 8–13). Among them, the most
common and best understood response is the activation of a
group of basic helix-loop-helix-Per/aryl hydrocarbon receptor
translocator/Sim domain transcription factors, called hypoxia-
inducible factors (HIF)¹ (14). In fact, HIF is responsible for the
induction of the vast majority of genes up-regulated in response
to decreased oxygen tension. HIF transcription factors are het-
erodimers of a constitutively expressed β subunit (HIF- β ; also
known as the aryl hydrocarbon receptor translocator) and an
oxygen-regulated α subunit (HIF- α). Although there are three
types of α subunits, HIF-1 α , HIF-2 α (also known as the endo-
thelial Per/aryl hydrocarbon receptor translocator/Sim do-
main), and HIF-3 α , encoded by different genes, it is currently
accepted that they are regulated in a similar fashion by oxygen
availability. The expression of HIF β and α subunits genes,
their mRNA stability, and the half-life of HIF β protein are not
influenced by oxygen levels. In contrast, HIF α proteins are
extremely unstable in the presence of oxygen due to a high
degradation rate by the proteasome, whereas their half-life is
dramatically increased under hypoxia (15). The realization
that tumoral cells deficient for the product of the tumor sup-
pressor gene *vhl* overexpressed the HIF-regulated gene vascular
endothelial growth factor (VEGF) (16, 17) led to the iden-
tification of pVHL as the substrate recognition component of an
E3 ubiquitin ligase complex that targets HIF α for proteosomal
degradation (18). It is noteworthy that pVHL binding to HIF α
is dependent on hydroxylation of two specific proline residues
on HIF α , a posttranslational modification that is only found
under normal oxygen tension (19–21). The recent cloning of the
enzymes responsible for HIF hydroxylation revealed that they
belong to the iron- and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase
superfamily (22, 23). To date, four different genes have been
reported to encode proteins with HIF proline hydroxylase ac-
tivity; three of them are closely related to *C. elegans* *egl-9* gene
and thus have been termed *EGL-Nine* homologs 1, 2, and 3
(EGLN1 to -3). Due to the simultaneous independent cloning of
EGLNs by different groups, they have been given other names
including HIF proline hydroxylase-2, -3, and -1 and proline
hydroxylase domain-2, -1, and -3, respectively; for simplicity,
we will use the EGLN nomenclature. Little information is
available regarding the fourth HIF proline hydroxylase, PH-4

Renal cells are critically dependent on oxygen for sur-
vival, it is not surprising that an evolutionarily conserved
mechanism able to sense oxygen levels is present in almost
all cell types studied. The activity of a variety of signaling

This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias
SOL0264 (to L. P.), Comunidad Autónoma de Madrid Grant
12/2001 (to L. P.), and Ministerio de Ciencia y Tecnología
AF2002-02344 (to L. P.) and SAF 2001-0215 (to M. O. L.). The
publication of this article was defrayed in part by the payment
of page charges. This article must therefore be hereby marked "adver-
tised" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate

*The authors contributed equally to this work.
Correspondence should be addressed. Tel.: 34-91-5202371;
Fax: 34-91-5202374; E-mail: lpeso.hlpr@salud.madrid.org.
Supported by Instituto de Salud Carlos III Grant 01/A009.

¹ The abbreviations used are: HIF, hypoxia inducible factor(s); VHL,
von Hippel-Lindau; VEGF, vascular endothelial growth factor; EGLN,
EGL-Nine homolog; Q-RT-PCR, quantitative real time PCR; E3, ubi-
quitin-protein isopeptide ligase.

EGLN3 Is a HIF Target Gene

(24). Moreover, it has not yet been proved that PH-4 directly acts on HIF α . Since dioxygenases require oxygen to catalyze substrate hydroxylations, it has been proposed that EGLNs function as the oxygen sensors that directly regulate HIF α stability. In fact, calculation of the K_m for oxygen of the EGLNs has revealed that it is high enough to support their role as oxygen sensors at the normal oxygen tension found in tissues (25).

Interestingly, the mRNAs of EGLN1 and -3, but not EGLN2, are induced by hypoxia in several cell types (22, 26–28). In most of the cases reported, the induction of EGLN3 mRNA is much more prominent than that of EGLN1. Moreover, the increased mRNA levels correlate with increased EGLN activity (27). As a whole, these results suggest that EGLN1 and -3 can be targets of the pVHL/HIF pathway, but no evidence for this hypothesis has been reported. Herein we have further investigated this possibility and have found that hypoxic induction of EGLN3 requires an intact pVHL/HIF pathway and that HIF activation is sufficient to induce EGLN3 gene transcription.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture and Reagents—The pVHL-deficient 786-O cell clones stably expressing wild type VHL (WT10), truncated VHL (1–115) or empty plasmid (PRC3) were kindly provided by Dr. Kaelin (Dana-Farber Institute, Boston, MA). Parental VHL-negative RCC4 cells (herein designated RCC4⁻) and the corresponding VHL-stable transfectants (RCC4⁺) were provided by Dr. Maxwell (Imperial College, London, UK). Parental VHL-negative RCC10 cells and a clone derived by stable transfection of VHL (VHL53) were provided by Dr. Plate (JWG University, Frankfurt, Germany). Parental VHL-defective UM-RC6 cells and the stable VHL transfectant, UM-RC6 3-4 (herein referred to as 3-4), were provided by Dr. Lerman and Dr. Ivanov (Laboratory of Immunobiology, NCI, National Institutes of Health, Frederick, MD). WT8-PP13 clone derives from WT8 cells upon stable expression of a P402A,P564G mutant HIF-1 α . All cells were maintained in RPMI 1640 medium with GLUTAMAX-I (Invitrogen). For WT-10, 1–115, PRC3, WT-10-PP13, VHL+53, and RCC4⁺, G418 sulfate 100 mg/ml (Promega) was added to culture medium. Hepa1 and HepaC4 cells were maintained in α -modified Eagle's medium (Biocrom) and 4.5/Ka13 cells in Ham's nutrient mixture F-12 (Euroclone). In all cases, culture medium was supplemented with 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin and 10% fetal bovine serum. Human umbilical vein endothelial primary cells were isolated and grown as previously described (29). Hypoxia (1%) was induced by culture of cells in an *in vivo* 400 hypoxia work station (Ruskin Technology). Deferoxamine was purchased from Sigma; anti-HIF-1 α was from Transduction Laboratories; anti-HIF-2 α /endothelial Per/aryl hydrocarbon receptor translocator/Sim domain was from Novus Biologicals (Littleton CO); and anti- α -Tubulin was from Sigma.

Western Blot—Immediately after treatments, cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline and harvested in 70–200 μ l of 1 \times loading buffer. Lysates were sonicated for 4 s, centrifuged at 4 $^{\circ}$ C for 2 min at 14,000 \times g, and resolved on 8–10% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad), blocked with 5% nonfat dry milk in TBS-T (50 mM Tris, pH 7.6, 150 mM ClNa, 0.1% Tween 20), and incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C with the indicated antibodies. Immunolabeling was detected by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences) and visualized with a digital luminence image analyzer (FUJIFILM LAS-1000 CH).

Quantitative RT-PCR—Immediately after treatments, cells were harvested into 1 ml of Ultraspec reagent (Biotecx; Houston, TX). Total RNA was extracted and quantified, and integrity was tested by gel electrophoresis. 1 μ g of total RNA from each sample was retrotranscribed to cDNA (Improm-II reverse transcriptase; Promega). 1–3 μ l of cDNA samples were used as template for amplification reactions carried out with the LC Fast Start DNA master SYBR Green I kit (Roche Applied Science) following the manufacturer's instructions. PCR amplifications were carried out in a Light Cycler System (Roche Applied Science), and data were analyzed with LightCycler software 3 version 3.5.28 (Idaho Technology Inc.). For analysis purposes, the amplicon for each of the analyzed genes was cloned, and known amounts of the cloned product were used to generate a standard curve. The number of copies of the gene of interest in each sample was extrapolated from the corresponding standard curve by the indicated software. For each sample, duplicate determinations were made, and the gene copy number

was normalized by the amount of β -actin. The primer pairs used in this study are reported elsewhere (27).

RESULTS

Hypoxia Increases EGLN1 and EGLN3 mRNA Levels and Up-regulation of Their Gene Expression—It has been shown that hypoxia up-regulates EGLN1 and -3, but not EGLN2, mRNA in several cell types including HeLa cells (22), osteosarcoma cells (26), rat pheochromocytoma PC12 cells (27), and human cardiovascular cells (28). In addition to these cell lines, we have found that EGLN1 is up-regulated in HepG2, and Jurkat cells and EGLN3 in HepG2 and Jurkat cells (Fig. 1A). In contrast, we found no consistent induction by hypoxia in any of these cell lines, despite the fact that VEGF, a well known HIF target gene, was up-regulated in all of them (Fig. 1A). Large differences were observed in basal levels of each EGLN among the distinct cell lines when comparing the quantity of each EGLN within the same line (Fig. 1B). EGLN3 mRNA levels were far below EGLN1 and -2 in all of the cases (Fig. 1B). Next, we asked whether the induction of EGLN mRNA levels was due to increased gene expression. To address this question, HeLa cells were exposed to hypoxia in the presence or absence of the transcription inhibitor actinomycin D, and the mRNA levels of EGLN1, EGLN3, and VEGF determined by quantitative time PCR (Q-RT-PCR). As shown in Fig. 1C, the induction of EGLN1, EGLN3, and VEGF by hypoxia was completely blocked by actinomycin D treatment, whereas HIF-1 α induction was unaffected, suggesting that their induction requires gene transcription.

The inhibition of EGLN activity mimics hypoxia, leading to HIF stabilization and induction of HIF target genes (30). Since hypoxia induces EGLN1 and -3 gene expression, we next asked whether this induction could be mimicked by interference with the activity of the EGLNs, as demonstrated previously for other genes regulated by the HIF pathway. To this end, HeLa cells were exposed to hypoxia or treated with normoxia, with deferoxamine or the 2-oxoglutarate co-inhibitor, deoxymethylglutarate (19). The hydroxylation of 2-oxoglutarate catalyzed by EGLNs requires iron, and it is this step that is inhibited by deferoxamine; thus, both iron chelators and 2-oxoglutarate analogs inhibit EGLN activity and result in HIF activation (19). As shown in Fig. 1D, deferoxamine treatment resulted in the induction of EGLN1 and -3 mRNAs up to a level similar to that observed under hypoxia. Similarly, deoxymethylglutarate treatment up-regulated both EGLN1 and -3 mRNAs more potently than hypoxia or deferoxamine treatment. As a control, VEGF level was monitored and, as shown in Fig. 1D, there was a good correlation between the induction of EGLN1 and -3 mRNAs and VEGF mRNAs.

Thus, EGLN1 and, more prominently, EGLN3 mRNA levels are commonly induced by hypoxia through a mechanism that requires its gene expression. Importantly, hypoxic induction of EGLN1 and -3 mRNAs can be mimicked by inhibition of EGLN activity, suggesting that it could be mediated by the EGLN/pVHL pathway.

EGLN3 mRNA Is Up-regulated in pVHL-deficient Tumor Cells—It has been previously shown that HIF target genes, including VEGF, are up-regulated under normoxic conditions in pVHL-deficient tumor cells (16, 17) as a consequence of constitutive stabilization of HIF α in these cells (18). In order to determine the involvement of the EGLN/pVHL/HIF pathway in the hypoxia-induced expression of EGLN1 and EGLN3, we decided to investigate whether the expression of these genes was up-regulated in pVHL-deficient cell lines. To this end, we determined the mRNA levels of the different EGLNs by quantitative RT-PCR in cell lines derived from vhl-negative tumor cells.

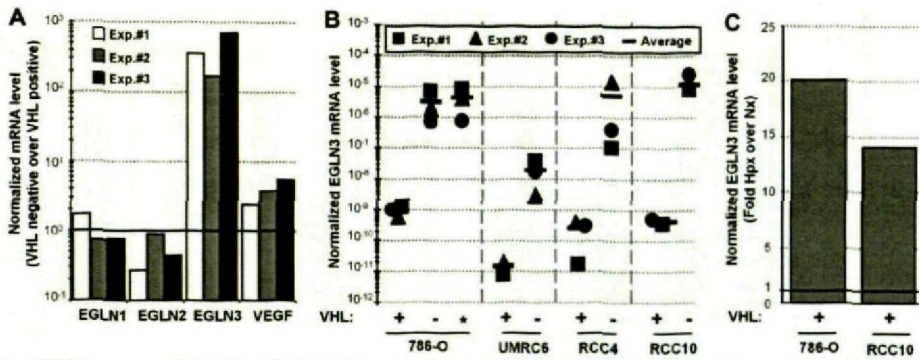


FIG. 2. EGLN3 mRNA is up-regulated in pVHL-deficient cells. A, the level of the indicated mRNAs was determined by Q-RT-PCR in the cell lines WT8 and PRC-3, derived from 786-O *vhl*-deficient cells upon stable transfection with a plasmid encoding for pVHL or an empty plasmid, respectively. We assigned a value of 1 (horizontal line) to the level of each mRNA on the pVHL-expressing cell line (WT8) and represent the values obtained in the pVHL-deficient cells (PRC3) as a fraction of the value in WT8 cells. The results of three independent experiments are represented. B, the amount of EGLN3 mRNA was determined by Q-RT-PCR in samples from the indicated *vhl*-deficient and -competent cells. The values obtained in three independent determinations and their averages are represented after normalization by the β -actin content. C, 786-O and RCC-10 cells stably expressing exogenous pVHL were exposed to hypoxia or left at normoxia for 8 h, and then the amount of EGLN3 mRNA was determined by Q-RT-PCR. The data represent the -fold induction of EGLN3 mRNA in cells exposed to hypoxia over the levels found in normoxic cells (horizontal line). Data shown are representative from one of three (786-O) or two (RCC-10) independent experiments. Note that graphs in A and B are in logarithmic units.

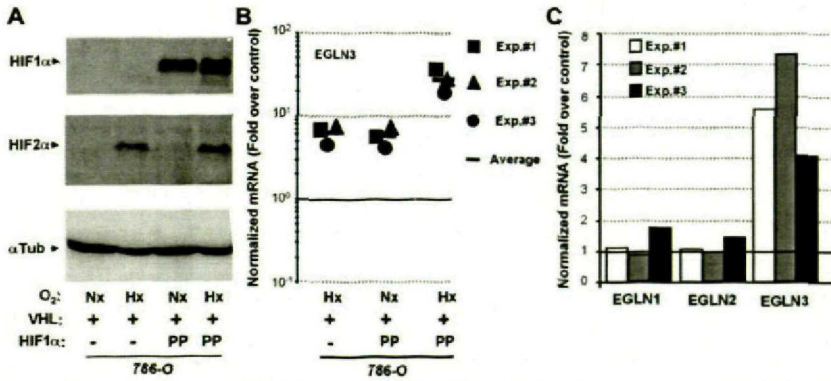


FIG. 3. HIF activity is sufficient to induce EGLN3. A, the 786-O cell line stably expressing exogenous pVHL and a derivative obtained by stable transfection of a mutant form of HIF-1 α (PP) harboring point mutations at Pro 402 and 564 were exposed to hypoxia (Hx) or normoxia (Nx) for 8 h, and the levels of HIF-1 α and 2 α proteins were determined by immunoblot. Results are representative of three independent experiments. B, the level of EGLN3 was determined by Q-RT-PCR in the samples described in A. We assigned a value of 1 (horizontal line) to the level of each mRNA on the pVHL-expressing cell line (WT8) and represent the values obtained in the rest of samples as -fold over that value. The results from three independent experiments and their averages are shown. C, the level of each EGLN was determined by Q-RT-PCR in the samples described in A. We assigned a value of 1 (horizontal line) to the level of each mRNA on the pVHL-expressing cell line (WT8) and represent the values obtained in the samples from HIF1 α -expressing cells as -fold over that value. The results from three independent experiments are shown.

after 8 h under hypoxia (Fig. 3B). Moreover, under hypoxia, the level of EGLN3 found in PP13 was higher than that observed in WT8 cells, probably due to cooperation of HIF1 α P402A/P564G with endogenous endothelial Per/aryl hydrocarbon receptor translocator/Sim domain (HIF-2 α) protein (Fig. 3B). In contrast to EGLN3, no significant increase of EGLN1 or EGLN2 was found in cells expressing active HIF (Fig. 3C). These data indicate that HIF α activation is sufficient to induce EGLN3, although they do not rule out that for maximal induction, other factors may be required.

HIF α Is Necessary for the Hypoxic Induction of EGLN1 and EGLN3—The data presented so far indicate that activation of HIF α induced by hypoxia or pVHL deficiency result in increased EGLN3 mRNA level. We then wanted to determine whether HIF α was necessary for EGLN induction by hypoxia. In order to address this question, we studied EGLN3 induction in cell lines with well defined deficiencies in the activation of HIF, such as HepaC4 and Ka13 cell lines. HepaC4 cells do not express a functional HIF β subunit, and as a consequence, HIF α protein is not able to transactivate target genes, in contrast to the parental Hepa1 cells (31). On the other hand, the Ka13 cell

line lacks HIF-1 α and HIF-2 α expression, since they were selected from the 4.5 Chinese hamster ovary cell line that did not express HIF-1 α (32). As shown in Fig. 4A, Hepa1 cells up-regulated EGLN3, EGLN1, and VEGF mRNAs upon exposure to low oxygen tension. In contrast, no change was observed in the levels of any of these mRNAs in the HIF β -deficient HepaC4 cells (Fig. 4A). Similar results were observed in the Ka13 cells; whereas EGLN3 and VEGF were induced by hypoxia in the parental 4.5 cells, no increase was found in the Ka13 cells lacking HIF α proteins (Fig. 4B). In the case of the Ka13 cells, both EGLN3 and VEGF normoxic levels were higher than those observed in the HIF-1 α -expressing 4.5 cells,² suggesting that other factors than HIF regulate the expression of these genes.

Thus, similar to other hypoxia-regulated genes, such as VEGF, the activity of HIF is necessary for the induction of EGLN-3 and EGLN-1 by low oxygen tension.

DISCUSSION

The results above indicate first that EGLN1 and -3 are induced by hypoxia and hypoxia-mimetic agents, through a

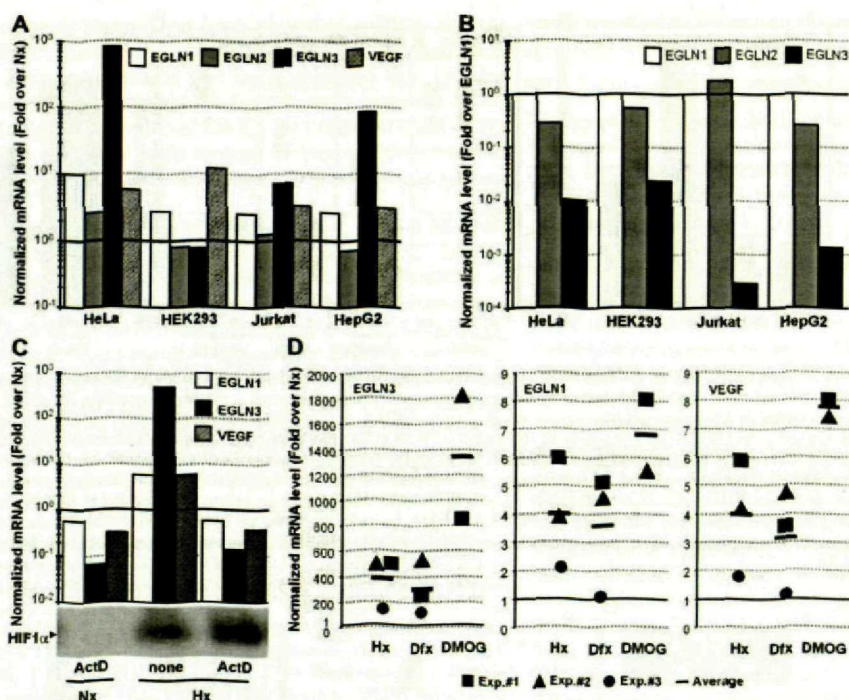


FIG. 1. EGLN1 and EGLN3 mRNAs are induced by hypoxia and hypoxia-mimetic agents. A, cells were exposed to hypoxia (Hx) or normoxia (Nx) for 8 h, and the level of each mRNA was determined by Q-RT-PCR. The amount of each mRNA in samples was normalized to the content of β -actin mRNA in the same sample. Data are represented as the normalized level of each mRNA in the hypoxia-treated cells over the normoxic values (horizontal line) obtained on each cell line. The mean from two independent experiments (Exp.) is shown. B, in order to compare the relative expression level of the different EGLNs, we assigned a value of 1 (horizontal line) to the normoxic levels of EGLN1 on each cell line and represent the amounts of EGLN2 and EGLN3 mRNAs as fractions of that value. Data shown are the average of the same two experiments in A. C, HeLa cells were exposed to hypoxia or normoxia for 8 h in the presence or absence of 0.5 μ M actinomycin D as indicated. The level of each mRNA was determined by Q-RT-PCR and expressed as -fold level obtained in untreated normoxic cells (set to 1; horizontal line). Parallel cultures were processed for immunoblot determination of HIF-1 α protein. A representative experiment of three is shown. D, HeLa cells were treated with 380 μ M deferoxamine, 1 mM deoxymethylglutarate (DMOG) or left untreated for 8 h. The level of each mRNA was determined by Q-RT-PCR and expressed as -fold level obtained in untreated normoxic cells (set to 1; horizontal line). Data represent the results of three independent experiments and their average. Note that the y axes of graphs in A, B, and C are in logarithmic units.

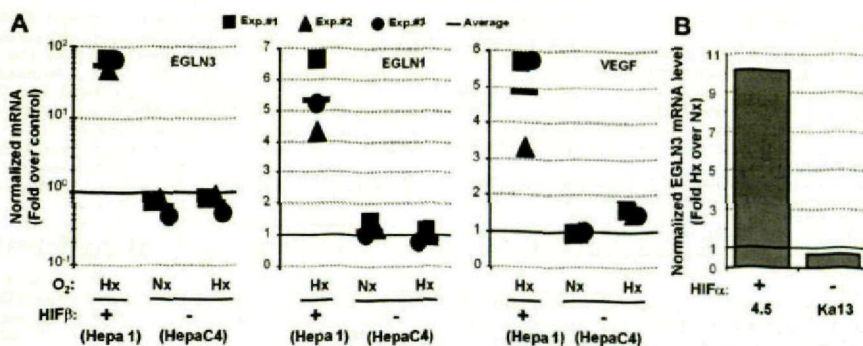
reference, the level of expression of each gene in the pVHL-deficient cell lines was always compared with the expression of that gene in cell lines forced to express normal pVHL by stable transfection of the wild type full-length *vhl* cDNA. As shown in Fig. 2A, the level of EGLN3 mRNA was dramatically increased in the *vhl*-negative 786-O cells, as compared with 786-O cells expressing exogenous wild type pVHL. The same result was obtained for VEGF, as previously reported (16, 17). In contrast to EGLN3 and VEGF, the mRNA levels of EGLN1 and -2 were similar in cells with or without functional pVHL (Fig. 2A). In order to confirm these results, we determined the level of EGLN3 mRNA in three additional pVHL-deficient cell lines obtained independently by different groups from human renal clear cell carcinomas. As in the case of the 786-O *vhl*-negative tumors (Fig. 2A), the level of EGLN3 was dramatically increased in the parental cell line (or mock-transfected) as compared with their pVHL expressing derivatives (Fig. 2B). Interestingly, EGLN3 was also increased in *vhl*-negative 786-O cells stably expressing a truncated, inactive, version of pVHL (Fig. 2B, asterisk). Importantly, restoration of pVHL function in *vhl*-deficient cell lines not only reduced basal normoxic levels of EGLN3 mRNA but also conferred the hypoxic inducibility (Fig. 2C) that was lost in the pVHL-deficient cells.² Thus, loss of VHL function results in deregulated EGLN3 expression but not EGLN1 or EGLN2 expression.

Constitutive Activation of HIF α Is Sufficient to Induce

EGLN3 mRNA—The best characterized consequence of pVHL loss is the activation of HIF; hence, the results presented above suggest that the up-regulation of EGLN3 found in *vhl*-deficient cells was due to HIF α activation. However, alterations associated with pVHL loss, other than HIF α stabilization, could also be the cause of the increased expression of EGLN3. To further explore these possibilities, we investigated the effect of forced expression of a pVHL-resistant mutant form of HIF α into 786-O cells stably expressing pVHL (WT-8 cell line). To this end, we stably transfected the WT-8 cell line with a cDNA encoding for a HIF α protein in which the prolines 402 and 564, which are hydroxylated under normoxia and required for pVHL binding (19, 20), were changed to alanine and glycine residues, respectively. The resulting cell line was designated PP13. 786-O cells do not express detectable amounts of HIF-1 α , but they do express HIF-2 α that is stabilized under hypoxic conditions (Fig. 3A). In the PP13 cell line, endogenous HIF-2 α showed oxygen dependence, whereas exogenous mutant HIF-1 α protein was expressed constitutively regardless of the oxygen tension (Fig. 3A). As a consequence of the constitutive expression of HIF1 α in the PP13 cell line, the basal level of VEGF mRNA is modestly, but reproducibly, incremented as compared with its expression in the WT8 cells, and a reporter construct encoding the luciferase gene under the control of hypoxia response element elements is activated.² Therefore, the PP13 cell line presents a constitutive active HIF pathway. Importantly, the basal level of EGLN3 was increased in PP13, as compared with WT-8, up to the level obtained in WT-8 cells

² M. C. Castellanos and L. del Peso, unpublished observations.

EGLN3 Is a HIF Target Gene



Functional HIF is required for the induction of EGLN1 and EGLN3 by hypoxia. A, parental Hepa1 cells and their HIF β -deficient cell line HepaC4, were exposed to hypoxia (Hx) or normoxia (Nx) for 8 h, and the expression levels of EGLN1, EGLN3, and VEGF were determined by Q-RT-PCR. We assigned a value of 1 (horizontal line) to the level of each mRNA on the cells with functional HIF β (Hepa1) under normoxic conditions and represent the values obtained in the rest of the samples as -fold over that value. The results from three independent experiments and averages are shown. Note that the graph showing EGLN3 data is in logarithmic units. B, the HIF α null cell line, Ka13, and the 4.5 parental cell line were exposed to hypoxia or normoxia for 24 h, and the expression level of EGLN3 was determined by Q-RT-PCR. We assigned a value of 1 (horizontal line) to the level of EGLN3 on each of the cell lines under normoxic conditions and represent the value obtained in the cells exposed to hypoxia as -fold normoxic value. Similar results were obtained in one more experiment.

tion-dependent mechanism; second that EGLN3, but not EGLN1, is up-regulated in pVHL-deficient cells and cells expressing a constitutively active form of HIF-1 α ; and finally that the activity of HIF is necessary for EGLN1 and EGLN3 induction by hypoxia. Hence, altogether the data presented here strongly indicate that EGLN1 and -3 genes are regulated by hypoxia through the EGLN/VHL/HIF pathway. In addition, we have identified HIF binding sites followed by E-box sequences (33) on EGLN1 and EGLN3 promoters. These sequences are missing in the 5-kb sequence upstream from the transcriptional start of the EGLN2 gene. Further work is required to determine whether these sequences are functional hypoxia response elements.

EGLNs are components of the HIF pathway, our results suggest a regulatory feedback loop in this signaling route. Decrease in EGLN activity during hypoxia might be required to ensure fast elimination of HIF after reoxygenation. It has been shown that HIF α down-regulation upon reoxygenation occurs faster after long periods of hypoxia (34). Alteration of the increase of the total amount of enzyme (EGLN) might alter the kinetics of the reaction, leading to changes in the reaction equilibrium after extended periods of hypoxia. As a consequence, at least under moderate hypoxia, EGLN induction should result in augmented HIF α levels and lead to a reduction of steady state levels of HIF α . Accordingly, we have found that in PC12 cells exposed to hypoxia, the amount of HIF2 α is higher 3 h after hypoxia than after 8 h.² On the other hand, it is important to note that the basal (normoxic) levels of EGLN3 are extremely low; thus, in the case of EGLN3, hypoxia induces a qualitative change in the cellular EGLN composition, not just a change in the amount of preexisting enzymes. Previous reports have already demonstrated that not all three EGLNs have the same affinity for HIF α (25, 35), and each EGLN has different activity toward the two target genes on HIF α (22, 25); thus, changes on the cellular EGLN composition may translate into a differential induction of the HIF α proteins or change the kinetics of response to hypoxia.

Interestingly, whereas EGLN3 mRNA level in VHL-deficient cells is dramatically increased as compared with cells with functional VHL function, the amount of EGLN1 was not increased. This result could indicate that, in contrast to EGLN3, VHL inactivation is not sufficient to induce EGLN1 gene expression and other, hypoxia-induced VHL-independent, fac-

tors are required. In fact, the experiments with the mutant form of HIF-1 α showed a poor induction of EGLN-3, as compared with the pVHL-deficient cells, suggesting that even EGLN3 may require other factors than HIF for a robust gene induction by hypoxia. In this sense, it was reported that hypoxic induction of VEGF is enhanced by the cooperation between HIF and activator protein-1 transcription factor (36). Moreover, the rat homologue of EGLN3, sm-20, was firstly identified as an early gene induced by mitogens (37). In smooth muscle cells, sm-20 induction by mitogens can be mimicked by cAMP analogs, suggesting the involvement of the cAMP-response element-binding transcription factors on EGLN3 induction. Thus, although HIF is required for the hypoxic induction of EGLN1 and EGLN3, other factors than HIF will probably modulate EGLN gene expression.

Acknowledgments—We thank S. Naranjo for critical reading of the manuscript, A. Vara for excellent technical assistance, Dr. N. Masson for the HIF1 α mutant construct, and Brenda Ashley for English assistance.

Note Added in Proof—While this manuscript was under review, Berra et al. (Berra, E., Benizri, E., Ginouves, A., Volmat, V., Roux, C., and Pouyssegur, J. (2003) *EMBO J.* **22**, 4082–4088) reported that inhibition of HIF-1 α expression by interference RNA (iRNA) prevented the induction of EGLN1 by hypoxia.

REFERENCES

- Conforti, L., and Millhorn, D. E. (1997) *J. Physiol. (Lond.)* **502**, 293–305
- Beitner-Johnson, D., and Millhorn, D. E. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 19834–19839
- Beitner-Johnson, D., Rust, R. T., Hsieh, T. C., and Millhorn, D. E. (2001) *Cell. Signal.* **13**, 23–27
- Conrad, P. W., Rust, R. T., Han, J., Millhorn, D. E., and Beitner-Johnson, D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 23570–23576
- Conrad, P. W., Millhorn, D. E., and Beitner-Johnson, D. (2000) *Adv. Exp. Med. Biol.* **475**, 293–302
- Alvarez-Tejado, M., Naranjo-Suarez, S., Jimenez, C., Carrera, A. C., Landazuri, M. O., and del Peso, L. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 22368–22374
- Richard, D. E., Berra, E., Gothe, E., Roux, D., and Pouyssegur, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 32631–32637
- Alfranca, A., Gutierrez, M. D., Vara, A., Aragones, J., Vidal, F., and Landazuri, M. O. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 12–22
- Arany, Z., Huang, L. E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M. A., Bunn, H. F., and Livingston, D. M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 12969–12973
- Bandyopadhyay, R. S., Phelan, M., and Faller, D. V. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1264**, 72–78
- Beitner-Johnson, D., Rust, R. T., Hsieh, T., and Millhorn, D. E. (2000) *Adv. Exp. Med. Biol.* **475**, 143–152
- Gozal, E., Simakajornboon, N., and Gozal, D. (1998) *J. Appl. Physiol.* **85**, 372–376
- Gozal, E., Simakajornboon, N., Dausman, J. D., Xue, Y. D., Corti, M., El-Dahr, S. S., and Gozal, D. (1999) *J. Neurochem.* **73**, 665–674
- Wang, G. L., and Semenza, G. L. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 21513–21518

EGLN3 Is a HIF Target Gene

15. Huang, L. E., Arany, Z., Livingston, D. M., and Bunn, H. F. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 32253–32259
16. Iliopoulos, O., Levy, A. P., Jiang, C., Kaelin, W. G. J., and Goldberg, M. A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 10595–10599
17. Siemeister, G., Weindel, K., Mohrs, K., Barleon, B., Martiny-Baron, G., and Marme, D. (1996) *Cancer Res.* **56**, 2299–2301
18. Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R., and Ratcliffe, P. J. (1999) *Nature* **399**, 271–275
19. Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (2001) *Science* **292**, 468–472
20. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., and Kaelin, W. G., Jr. (2001) *Science* **292**, 464–468
21. Yu, F., White, S. B., Zhao, Q., and Lee, F. S. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9630–9635
22. Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A., Tian, Y. M., Masson, N., Hamilton, D. L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Schofield, C. J., and Ratcliffe, P. J. (2001) *Cell* **107**, 43–54
23. Bruick, R. K., and McKnight, S. L. (2001) *Science* **294**, 1337–1340
24. Oehme, F., Ellinghaus, P., Kolkhof, P., Smith, T. J., Ramakrishnan, S., Hutter, J., Schramm, M., and Flammia, I. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**, 343–349
25. Hirsilä, M., Koivunen, P., Günzler, V., Kivirikko, K. I., and Myllyharju, J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 30772–30780
26. Metzen, E., Berchner-pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J. H., Klinger, M., Huang, Q. W., Wotzlaw, C., Hellwig-Burgel, T., Jell, Acker, H., and Fandrey, J. (2002) *J. Cell Sci.* **116**, 1319–1326
27. Naranjo-Suárez, S., Castellanos, M. C., Alvarez-Tejado, M., Landazuri, M. O., and del Peso, L. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 31
28. Cioffi, C. L., Liu, X. Q., Kosinski, P. A., Garay, M., and Bowen, E. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**, 947–953
29. Munoz, C., Castellanos, M. C., Alfranca, A., Vara, A., Esteban, M. A. J. M., and de Landazuri, M. O. (1996) *J. Immunol.* **157**, 3587–3591
30. Warnecke, C., Griethe, W., Weidemann, A., Jürgensen, J. S., Bachmann, S., Ivashchenko, Y., Wagner, I., Frei, U., Wiesner, Eckardt, K.-U. (2003) *FASEB J.* **17**, 1186–1188
31. Wood, S. M., Gleadle, J. M., Pugh, C. W., Hankinson, O., and Ratcliffe, P. J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 15117–15123
32. Wood, S. M., Wiesener, M. S., Yeates, K. M., Okada, N., Pugh, C. W., P. H., and Ratcliffe, P. J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 8360–8366
33. Kimura, H., Weisz, A., Ogura, T., Hitomi, Y., Kurashima, Y., Hara, D'Acquisto, F., Makuuchi, M., and Esumi, H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 2292–2298
34. Berra, E., Richard, D. E., Gothe, E., and Pouyssegur, J. (2001) *FEBS Lett.* **491**, 85–90
35. Huang, J., Zhao, Q., Mooney, S. M., and Lee, F. S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 39792–39800
36. Damert, A., Ikeda, E., and Risau, W. (1997) *Biochem. J.* **327**, 419
37. Wax, S. D., Rosenfield, C. L., and Taubman, M. B. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 13041–13047



Role of diacylglycerol induced by hypoxia in the regulation of HIF-1 α activity

Elisa Temes,^{a,1} Silvia Martín-Puig,^{a,1} Julián Aragonés,^{a,2} David R. Jones,^{b,3}
Gemma Olmos,^a Isabel Mérida,^b and Manuel O. Landázuri^{a,*}

^a Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), c/ Diego de León 62, 28006 Madrid, Spain

^b Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Received 21 October 2003

†

Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) is a critical transcription factor for the adaptation to lowered oxygen environments. We have previously reported that hypoxia induced phosphatidic acid (PA) accumulation through diacylglycerol kinase (DGK) activity and provided evidence that this PA production regulated HIF-1 expression. Here we report that hypoxia also produces a marked intracellular accumulation of diacylglycerol (DAG) in different cell types. The previously proposed inhibitor of phosphatidylcholine lipase C (PC-PLC)/sphingomyelin synthase (SMS) activities, D609, specifically abrogates both hypoxia-dependent DAG accumulation and hypoxia-induced HIF-1 expression. We show that DAG-dependent protein kinase C (PKC) isoforms do not play a critical role in the regulation of HIF-1 expression. D609 inhibits PA accumulation triggered by hypoxia, suggesting that DAG acts as substrate for its conversion into PA by DGK upon these conditions. Therefore, this work provides novel evidence for the existence of DAG/PA-dependent intracellular mechanisms involved in the regulation of HIF-1 expression.

Elsevier Inc. All rights reserved.

† HIF-1; Hypoxia; Diacylglycerol; Phosphatidic acid; Signal transduction; Protein regulation; Lipid second messengers

Cells respond to low oxygen tension by inducing a transcription program to overcome this situation. It has been demonstrated that hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) is the transcription factor that controls the hypoxia-dependent response [1]. HIF-1 regulates various genes including the vascular endothelial growth factor (VEGF), erythropoietin (EPO), and glycolytic enzymes among others [2].

HIF-1 is a heterodimer composed of α and β subunits. HIF-1 α belongs to the basic helix–loop–helix PAS (Per, Arnt, and Sim) family of transcription factors [3]. In

normoxia, the tumor suppressor Von Hippel–Lindau (VHL), which is a component of the E3 ubiquitin ligase complex, interacts with the α subunit of HIF-1 (HIF-1 α) and this recognition leads to HIF-1 α ubiquitination and subsequent proteasome-dependent degradation [4,5]. It has been recently demonstrated that hydroxylation of proline residues 402 and 564 of HIF-1 α by a novel class of prolyl hydroxylases (PHDs) is required for the interaction of VHL with HIF-1 α [6,7]. Exposure of cells to hypoxia induces stabilization of the HIF-1 α subunit due to the inhibition of PHDs activity, leading to the formation of the HIF-1 α / β heterodimers that bind to DNA hypoxia-responsive elements (HRE) to drive transcription [8]. PHDs have been recently involved in a HIF-dependent feedback regulatory mechanism, supporting their role as key molecules in oxygen sensing [9,10].

Cells respond to multiple extracellular stimuli by acutely generating lipid second messengers. We have previously shown that hypoxia leads to an increase in

* Corresponding author. Fax: +34-91-520-23-74.

E-mail address: mortiz.hlpr@salud.madrid.org (M.O. Landázuri).

¹ Equal contribution.
Present address: Center for Transgene Technology and Gene Therapy, VIB, KU Leuven Campus Gasthuisberg O&N, Herestraat 49, 3000 Leuven, Belgium.

² Present address: Division of Cellular Biochemistry, The Netherlands Cancer Institute Plesmanlaan 121.1066 CX Amsterdam, The Netherlands.

cellular level of phosphatidic acid (PA) through action of diacylglycerol kinase (DGK) [11]. Another lipid messenger is diacylglycerol (DAG) that arise from several sources. The best established is the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) by phospholipase C (PI-PLC) [12,13]. An alternative mechanism is the breakdown of PC by a putative eukaryotic phosphatidylcholine phospholipase C (PC-PLC)-like activity [14,15]. Although protein/s responsible for this activity have not yet been cloned in mammalian cells, the existence of this alternative pathway is supported by the use of D609, a previously proposed inhibitor of PC-PLC-like activity [16–18]. In addition, it has been suggested that cellular sphingomyelin synthase activity could account for the putative PC-PLC activity since this enzymatic activity converts simultaneously PC ceramide into DAG and sphingomyelin and it is inhibited by D609 [19]. One of the main intracellular functions of DAG is to serve as a second messenger activator of classical and novel protein kinases (PKC) isoforms that mediate many cellular responses including cell growth and differentiation [20,21]. In the present work we report that hypoxia causes DAG accumulation. Elimination of this hypoxia-induced DAG by pharmacological inhibition of PC-PLC-like activity or SMS activity specifically abrogates HIF-1 transcription. In contrast, the PI-PLC inhibitor, U73122, does not affect the HIF-1 transcription. Furthermore, here we discard the role of the dependent PKCs upon HIF-1 activation by all these data led us to suggest that hypoxia-induced DAG accumulation serves as substrate for the generation of PA that regulates HIF-1 activation.

Materials and methods

[³²P]Orthophosphate (carrier free) and [γ -³²P]ATP (10 Ci/mmol) were purchased from Amersham-Pharmacia Biotech (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Silica gel thin layer chromatography (TLC) plates (60 Å, LK6D) were from Whatman. D609 was purchased from Sigma (St. Louis, MO). Ro31-7321 were from Calbiochem (La Jolla, CA). The authentic standard for 1,2-dioleoyl phosphatidic acid and phorbol were from Sigma (St. Louis, MO). Analytic grade organic solvents were from Merck (Darmstadt, Germany).

Cell culture and cellular treatments. HeLa cells were grown in the presence of 10% (v/v) foetal calf serum (FCS) in Dulbecco's MEM (Biochrom KG, Germany). 293-T cells were grown in Dulbecco's MEM (Biochrom KG, Germany) in the presence of 10% (v/v) foetal calf serum (FCS) in the presence of 10% (v/v) foetal calf serum (FCS) (Gibco International, Woodside, UK). Cells were routinely cultured in 5% CO₂ (normoxic conditions) at 37°C. Cellular exposure to hypoxia was performed as previously described with a mixture of 5% CO₂ and 94% N₂ [11].

Measurement of total cell DAG. Lipids were extracted by the method of Bligh and Dyer [22] from cells exposed to normoxia or hypoxia for 5–6 h in the presence or absence of D609. The amount of DAG was determined by its conversion into [³²P]PA by Escherichia coli DGK in the presence of [γ -³²P]ATP as previously described [11]. DAG levels were corrected to the total phospholipid

phosphate content. The method of Bartlett [24] was used for the assay of total phosphate.

Measurement of PA. Cells were cultured in phosphate-free medium supplemented with 10% (v/v) foetal calf serum (extensively dialyzed against 0.9% (w/v) NaCl) for 90 min before the addition of [³²P]orthophosphate (100 μ Ci/ml) for an additional 90 min. Then, the cells were exposed to normoxia or hypoxia. Phospholipids were then extracted by the method of Bligh and Dyer [22] and analyzed as previously described [11]. Quantification of the band corresponding to [³²P]PA was performed using the Bio-Rad Molecular Analyst Software.

Determination of calcium levels. Serum-starved cells for 20 h were resuspended in Hanks' Balanced Salt Solution (HBBS) at 4×10^6 cells/ml. Thereafter they were labeled adding fluo-3, AM (4 μ M/ml) (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands), for 30 min at 37°C. Then cells were washed twice with HBBS. Thereafter, the cells were pretreated with the PI-PLC inhibitor, U-73122, or vehicle for 1 h before serum stimulation. Then, fluorescence intensity was analyzed by flow cytometry in a FACScalibur apparatus (Beckton-Dickinson).

Recombinant plasmids and transfections. The HIF-1-responsive plasmid p9HIF1-Luc, EGR-responsive plasmid pEGR-Luc, and pCMV-LUC have been previously described [11,25]. Confluent cell cultures growing in 100 mm culture dishes were transfected in Dulbecco's MEM containing 10% (v/v) FCS with 1 μ g p9HIF-1 Luc or 1 μ g pCMV Luc in combination with 19 μ g of empty plasmid pCDNA3 in the case of 293-T cells; and 20 μ g of p9HIF-1 Luc or 20 μ g of pCMV Luc in the case of HeLa cells by using a standard calcium phosphate method [26]. After 10 h of transfection, cells were pooled and plated onto 24-well cell plates. After 14–16 h cells were pretreated or not with D609, Ro 31-8220 or U-73122 before incubating in normoxic or hypoxic conditions for an additional 6 h. Thereafter the cells were lysed and luciferase activity was measured (Promega, Madison, WI) with a Lumat LB9501 luminometer (Berthold, Wildbad, Germany).

Immunoblotting. Whole cellular lysates were resolved on 8% polyacrylamide-SDS gels and transferred to nitrocellulose membranes. The levels of HIF-1 α subunit or Sp-1 protein were detected with specific antibodies (Transduction Laboratories and Santa Cruz Biotechnology, respectively) by Western blotting.

Results

Hypoxia induces DAG accumulation through a PC-PLC/SMS activity

We have previously reported that the cellular exposure to low oxygen tension produces an increase in the total cell DAG content of HeLa cells [11]. Here we analyzed whether this phenomenon was present in another cell type. The exposure of 293-T cells to hypoxia induced a significant increase in total cell DAG, similar to HeLa cells (Fig. 1). In agreement with our data, hypoxia has also been found to increase the total DAG content in neonatal rat ventricular myocytes and in Hep3B cells [27,28]. The magnitude of the total cell DAG increase observed in hypoxia is similar to that observed in response to other stimuli [14,15]. Therefore, it could be proposed that the accumulation of DAG is a common mechanism in the cellular response to hypoxia.

A PC-PLC-like activity as well as SMS activity has been reported to generate DAG in response to several stimuli. The effect of the previously described inhibitor

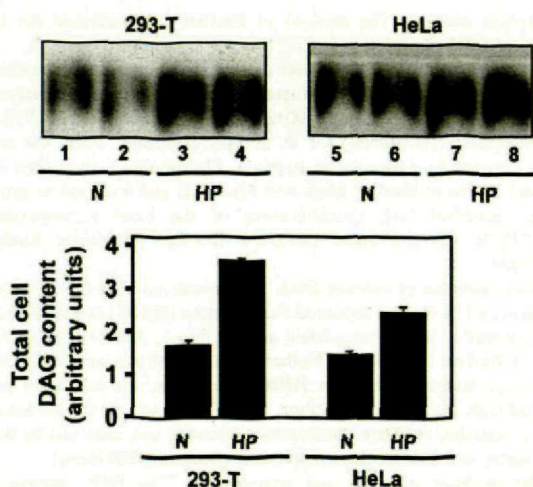


Fig. 1. Hypoxia induces DAG production. HeLa and 293-T cell cultures were incubated for 6 h in normoxia (N) or hypoxia (HP). Cellular lipids were extracted and DAG levels were determined by the conversion of DAG into [32 P]PA. [32 P]PA generated was separated from all other phospholipids by TLC and then visualized by autoradiography (upper panel). Quantification of the radiolabeled PA normalized to the total phospholipid phosphate content is shown (lower panel). An experiment performed in duplicate is shown. Similar results were obtained in two further experiments.

of these enzymatic activities, D609, [17,29] was analyzed on hypoxia-induced DAG accumulation. We found that pretreatment of 293-T and HeLa cells with D609 completely prevented the increase of DAG levels in response to hypoxia (Fig. 2). It is important to note that the dose of D609 required to abrogate hypoxia-induced DAG accumulation was 100 μ g/ml in HeLa cells and 40 μ g/ml in 293-T cells (Fig. 2), indicating a differential sensitivity to D609 between these two cell types. These doses were similar to those required to prevent DAG accumulation observed in response to other stimuli [16] as well as to inhibit the putative PC-PLC/SMS activity *in vivo* and *in vitro* [19]. The basal level of DAG was also slightly affected (Fig. 2), suggesting that the generation of DAG through a PC-PLC/SMS activity is operative under normoxic conditions and that oxygen deprivation enhances this pathway of DAG accumulation.

Effect of pharmacological inhibition of hypoxia-induced DAG accumulation on HIF-1-dependent transcription

We also analyzed whether the inhibition of hypoxia-induced DAG accumulation affected the activation of HIF-1. As a first approach, 293-T cells were transfected with the HIF-1-responsive reporter plasmid p9HIF-1 Luc (see Materials and methods). Pretreatment of transfected 293-T cells with D609, at doses identical to those that inhibited hypoxia-inducible total cell DAG accumulation (Fig. 2), inhibited the hypoxia-inducible transcription promoted by p9HIF-1 Luc (Fig. 3A, upper

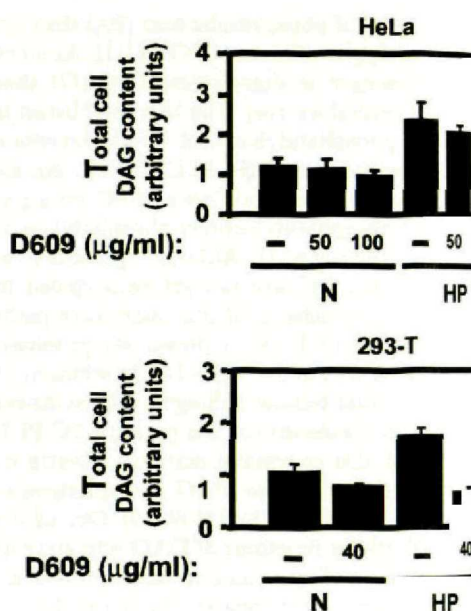
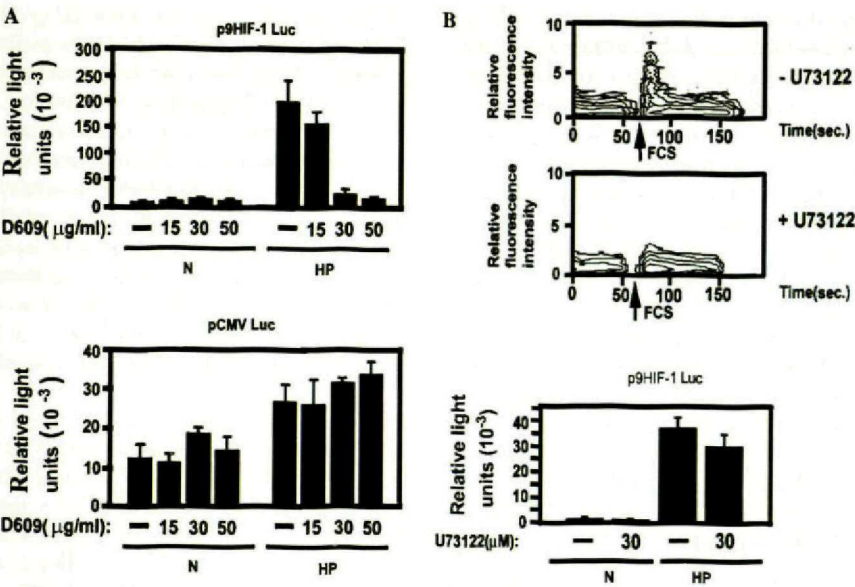


Fig. 2. The PC-PLC/SMS activity inhibitor D609 prevents induced DAG accumulation. HeLa cells (upper panel) and 293-T cells (lower panel) were incubated with vehicle (water 2% v/v) or the indicated doses during exposure to normoxia (N) or hypoxia (HP) for 6 h. Cellular lipids were extracted and DAG levels were determined as indicated above. An experiment performed in duplicate is shown. Similar results were obtained in two further experiments.

panel), without affecting pCMV-Luc-dependent transcription (Fig. 3A, lower panel). These results conclude that pharmacological inhibition of hypoxia-induced DAG accumulation with D609 impairs HIF-1-dependent transcriptional activity.

To further investigate hypoxia-induced DAG accumulation, we analyzed the possible role of PI-PLC in HIF-1 activation. Therefore, HIF-1-dependent transcription was measured in the presence of the previously reported PI-PLC inhibitor, U73122 [30,31]. First of all, we determined the doses of U73122 required to abolish intracellular PI-PLC activity. For this purpose, we analyzed intracellular calcium accumulation in response to mitogen stimulation, a well-known effect mediated by PI-3K response to mitogens [32]. We found that a 30 μ M was sufficient to abolish the intracellular calcium peak observed in response to serum in 293-T cells (Fig. 3B, upper panel). In parallel experiments, we found that 30 μ M of U-73122 did not affect significantly p9HIF-1 Luc-driven transcription (Fig. 3B, lower panel). These data ruled out an essential role of PI-3K activity in the transcriptional activity regulation of HIF-1-dependent transcription.

One of the events required to promote HIF-1-dependent transcription is the hypoxia-induced transcription and subsequent accumulation of the HIF-1 subunit [5–7]. Therefore, we analyzed



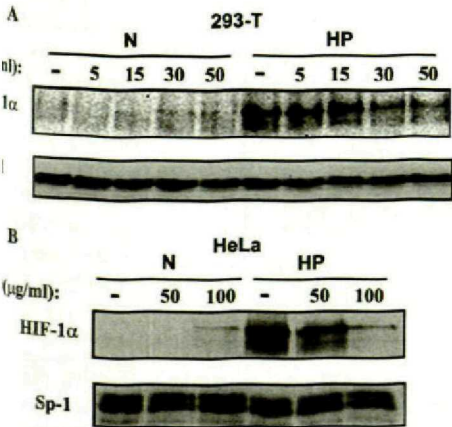
pharmacological inhibition of PC-PLC/SMS activities but not of PI-PLC prevents HIF-1-dependent transcription. (A) 293-T cells transfected with the p9HIF-1 Luc (upper panel) or pCMV Luc (lower panel) were incubated with vehicle (water 2% v/v) or the indicated D609 during exposure to normoxia (N) or hypoxia (HP) for 6 h. After such incubation luciferase activity was determined in cell lysates. Each bar represents the luciferase activity (means \pm SD) of duplicate cell lysates from one representative experiment. Similar results were observed in five independent experiments. Normoxic values corresponding to p9HIF-1 Luc were magnified 10 \times . (B) 293-T cells loaded with fluo-3, AM were incubated with vehicle (Me₂SO, 0.3% v/v) or U73122 at 30 μ M for 30 min before determination of intracellular calcium level in response to FCS by fluorescence analysis (upper panel). A representative result from three more is shown. 293-T cells transiently transfected with the p9HIF-1 Luc (lower panel) were preincubated with vehicle (Me₂SO, 0.3% v/v) or in the presence of U73122 (30 μ M) for 1 h and then exposed to normoxia (N) or hypoxia (HP) for an additional 6 h. Luciferase activity was determined in cell lysates.

diated inhibition of the hypoxia-induced intracellular total cell DAG affected the hypoxia-induced accumulation of the HIF-1 α subunit. We found that inhibition of the generation of the hypoxia-induced

HIF-1 α subunit at the same doses that were able to interfere with the hypoxia-triggered DAG production in both, HeLa and 293-T cells (Figs. 4A and B). These data indicate that there is a close correlation between DAG production and HIF-1 α expression upon hypoxic stimulation. As a control for specificity, we also analyzed the protein level of the Sp-1 transcription factor in the same lysates by Western blotting (Fig. 4). Taken together all these results suggest that the hypoxia-triggered DAG accumulation, probably through the action of PC-PLC/SMS activity, plays a role in the activation of HIF-dependent transcription due to its involvement in the hypoxia-induced stabilization of HIF-1 α subunit.

PKC activity is not essential for hypoxia-induced HIF-1 α accumulation. Role of PA

Since we had observed that DAG was important for HIF-dependent transcription activity, we decided to investigate through which mechanisms was DAG mediating this effect. One of the well-known DAG-dependent intracellular effects is the activation of various PKC isoforms [20,21]. Therefore, we asked whether PKC activity was necessary for the regulation of HIF-1 expression. To further investigate this possibility we used the previously recognized PKC inhibitor Ro 31-8220



D609 interferes with the hypoxia-dependent accumulation of HIF-1 α subunit. 293-T cells (A) and HeLa cells (B) treated with vehicle (water 2% v/v) or D609 at the indicated doses were exposed to normoxia (N) or hypoxia (HP) for 6 h. HIF-1 α and Sp-1 protein levels were determined by immunoblotting from whole cell lysates. A representative result from four performed is shown.

that very efficiently inhibits the effects induced by PMA, an activator of DAG-dependent PKC isoforms [33]. We tested the inhibitory effect of Ro 31-8220 on the previously described PMA-dependent transcription driven by the early growth response factor 1 (EGR 1) [34]. As shown in the lower panel of Fig. 5A, Ro 31-8220 at doses of 0.5 and 1 μ M was enough to abrogate the PMA-induced transcription driven by EGR transcription factor. In contrast, the same doses of Ro 31-8220 did not inhibit the HIF-1-dependent transcription (Fig. 5A, upper panel). In agreement with these data we found that Ro31-8220 at 1 μ M did not affect the hypoxia-induced HIF-1 α subunit accumulation neither in

HeLa nor in 293-T cell lines (Fig. 5B). There we conclude from these experiments that cellular dependent PKC activity is not essential for the action of HIF-1 expression by hypoxia.

We have previously reported that hypoxia significant PA accumulation most likely via the DGK [11]. Furthermore, evidence has been provided a role of DGK in the regulation of HIF-1 not at low oxygen tension [11] but also by hypoxia such as nickel chloride [35]. We have also shown the importance of this PA upon HIF-1 activation [11] we have ruled out the role of PKCs in HIF-1 activation as we next asked whether the hypoxia-induced D

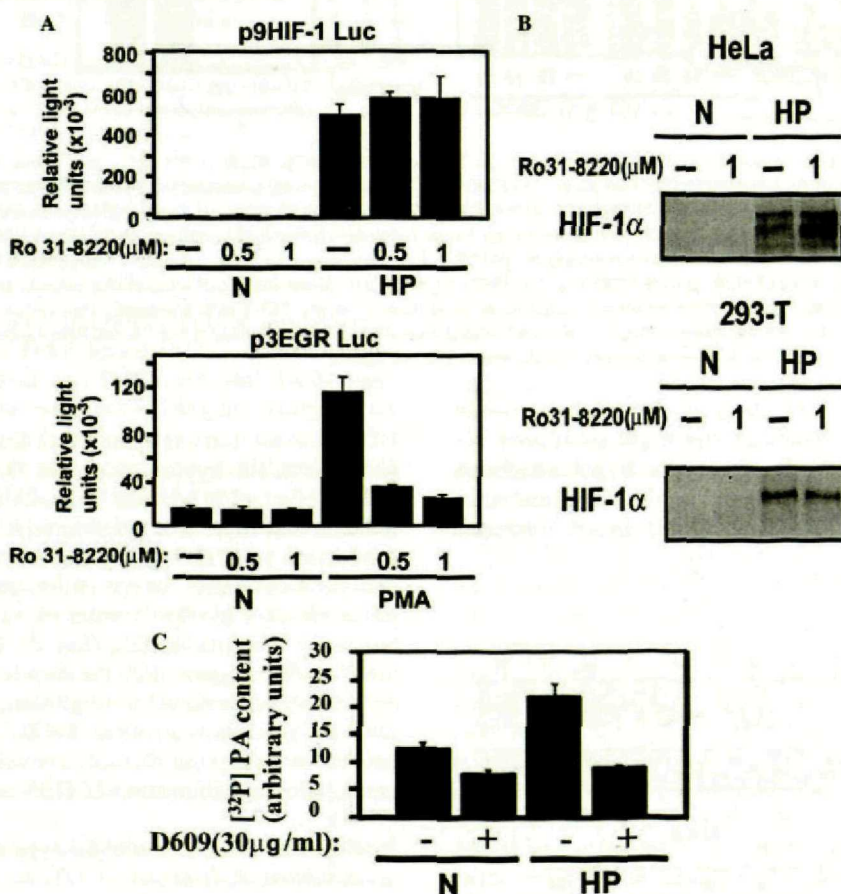


Fig. 5. The inhibition of cellular PKC activity did not prevent hypoxia-induced HIF-1 α accumulation. D609 inhibits phosphatidic acid as triggered by hypoxia. (A) HeLa cells transiently transfected with the p9HIF-1 Luc (upper panel) or p3EGR Luc (lower panel) were pretreated with vehicle (-) (Me_2SO , 0.1% v/v) or the indicated doses of Ro 31-8220 for 15 min before exposure to normoxia (N), hypoxia (HP) or PMA for an additional 6 h. After such incubation luciferase activity was determined in cell lysates. Each bar represents the luciferase activity (mean \pm SD) of duplicate cell lysates from one representative experiment. Similar results were observed in five independent experiments. Normoxia response to p9HIF-1 Luc were magnified 10 \times . (B) HIF-1 α protein level was analyzed by immunoblotting of whole lysates of HeLa and 293-T cells pretreated with vehicle (-) (Me_2SO , 0.1%) or Ro 31-8220 for 15 min before exposure to normoxia (N) or hypoxia (HP) for an additional 6 h. A representative experiment from three performed is shown. (C) [32 P]Orthophosphate metabolically labeled 293-T cells were incubated with D609 (30 μ g/ml) or vehicle (water 2%) during exposure to hypoxia (HP) or normoxia (N) for 6 h. Cellular phospholipids were then extracted and [32 P] PA content was determined as described (see Materials and methods). An experiment performed in duplicate is shown. Three more experiments gave identical result.

ported to PA through DGK activity. Here we show that inhibition of DAG production with D609 results in the inhibition of hypoxia-induced PA accumulation (Fig. 5C). D609 also slightly reduced normoxic PA, indicating that conversion of DAG into PA is occurring in normoxic cells and is markedly enhanced upon hypoxia exposure. Therefore, these data lead us to conclude that hypoxia-induced elevation of cellular PA through DGK is a direct consequence of hypoxia-induced DAG accumulation.

In the present work we propose that generation of PA in response to hypoxia could be due to a PC-PLC/SMS activity, since D609 inhibits such DAG accumulation. In agreement with these data, Goldberg et al. [27] showed that exposure of neonatal rat cardiomyocytes to hypoxia led to a D609-sensitive DAG accumulation. Furthermore, it has been found in *in vivo* studies that DAG accumulation, probably from breakdown of PC, occurs under ischemic/hypoxic conditions [36]. All these data indicate that DAG accumulation can be used as a common molecular marker of cellular response to oxygen deprivation and suggest a role of a SMS activity in cellular response to hypoxia. Therefore, we have also provided evidence for the involvement of PC-PLC/SMS activity in the regulation of HIF-1 since D609, at the same doses that affect hypoxia-induced DAG accumulation, prevents HIF-1 α accumulation as well as HIF-1-dependent transcription. Further analysis of the role of this PC-PLC/SMS activity in hypoxia responses will require the cloning of the active mammalian enzymes.

Argente et al. [27] have also reported that hypoxia-induced DAG accumulation led to the translocation of HIF-1 α to the nucleus and activation of DAG-dependent PKC [27]. However, we have found that effective inhibition of DAG production with Ro 31-8220 did not affect neither HIF-1 α accumulation nor HIF-1-dependent transcription. In agreement with our data, Yan et al. [37] reported that hypoxia-dependent induction of glucose transporter GLUT1 and HIF-1 is not affected in pKCB null (–/–) mice. Therefore, these results indicate that DAG-dependent PKC activity does not play an essential role in the hypoxia-induced HIF-1 α activation. However, DAG-sensitive PKCs have been involved in HIF-1 α gene expression in vascular smooth muscle cells in response to angiotensin II [38]. Therefore, DAG-sensitive PKCs could have a role in HIF-1 α expression depending on the cell type.

We have previously reported that PA accumulation in response to hypoxia is generated primarily by DGK activity [1]. Now we hypothesize that DAG increments upon hypoxia could serve as substrate for this

enzyme. The fact that the same doses of D609 that inhibited the hypoxia-induced DAG level were able to prevent PA production supports our previous data. Furthermore, since our previous work proposes a role of PA in HIF-1 activation upon hypoxia, we can assume that the effect observed upon HIF-1 by DAG inhibition with D609 may be due to the subsequent decrease in PA level. In this regard, we are currently investigating in more detail the role of PA in HIF activation and we have obtained data suggesting that PA could be involved in the VHL-HIF-1 recognition process (manuscript in preparation). However, further experiments will be required to completely support our hypothesis.

Our previous evidence for the role of DGK in the regulation of HIF-1 [11] and currently presented data strongly suggest that the role of DAG in the regulation of HIF-1 depends on its conversion to PA through DGK but not on DAG-dependent PKC activity, proposing a coordinated action of PC-PLC/SMS and DGK enzymatic activities.

References

- [1] C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe, Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system, *Nat. Med.* 9 (2003) 677–684.
- [2] R.H. Wenger, Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation, *J. Exp. Biol.* 203 (2000) 1253–1263.
- [3] G.L. Wang, G.L. Semenza, Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 1230–1237.
- [4] W.G.J. Kaelin, Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 673–682.
- [5] P.H. Maxwell, M.S. Wiesener, G.W. Chang, S.C. Clifford, E.C. Vaux, M.E. Cockman, C.C. Wykoff, C.W. Pugh, E.R. Maher, P.J. Ratcliffe, The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis (see comments), *Nature* 399 (1999) 271–275.
- [6] P. Jaakkola, D.R. Mole, Y.M. Tian, M.I. Wilson, J. Gielbert, S.J. Gaskell, A. Kriegsheim, H.F. Hebestreit, M. Mukherji, C.J. Schofield, P.H. Maxwell, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe, Targeting of HIF-1 α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation, *Science* 292 (2001) 468–472.
- [7] M. Ivan, K. Kondo, H. Yang, W. Kim, J. Valiando, M. Ohh, A. Salic, J.M. Asara, W.S. Lane, W.G. Kaelin Jr., HIF-1 α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing, *Science* 292 (2001) 464–468.
- [8] L.E. Huang, Z. Arany, D.M. Livingston, H.F. Bunn, Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 32253–32259.
- [9] E. Berra, E. Benizri, A. Ginouves, V. Volmat, D. Roux, J. Pouyssegur, HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia, *EMBO J.* 22 (2003) 4082–4090.
- [10] L. Del Peso, M.C. Castellanos, E. Temes, S. Martin-Puig, Y. Cuevas, G. Olmos, M.O. Landazuri, The von Hippel-Lindau/hypoxia inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 123–128.
- [11] J. Aragones, D.R. Jones, S. Martin, M.A. San Juan, A. Alfranca, F. Vidal, A. Vara, I. Merida, M.O. Landazuri, Evidence for the involvement of diacylglycerol kinase in the activation of

- hypoxia-inducible transcription factor 1 by low oxygen tension, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 10548–10555.
- [12] M. Katan, Families of phosphoinositide-specific phospholipase C: structure and function, *Biochim. Biophys. Acta* 1436 (1998) 5–17.
 - [13] W.D. Singer, H.A. Brown, P.C. Sternweis, Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D, *Annu. Rev. Biochem.* 66 (1997) 475–509.
 - [14] O. Kozawa, A. Suzuki, T. Kaida, H. Tokuda, T. Uematsu, Tumor necrosis factor- α autoregulates interleukin-6 synthesis via activation of protein kinase C. Function of sphingosine 1-phosphate and phosphatidylcholine-specific phospholipase C, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 25099–25104.
 - [15] J. Zamorano, M.D. Rivas, A. Garcia-Trinidad, C.K. Qu, A.D. Keegan, Phosphatidylcholine-specific phospholipase C activity is necessary for the activation of STAT6, *J. Immunol.* 171 (2003) 4203–4209.
 - [16] S. Schutze, K. Potthoff, T. Machleidt, D. Berkovic, K. Wiegmann, M. Kronke, TNF activates NF- κ B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced 'acidic' sphingomyelin breakdown, *Cell* 71 (1992) 765–776.
 - [17] I. Preuss, I. Kaiser, U. Gehring, Molecular characterization of a phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 5081–5091.
 - [18] H. Ito, S. Adachi, M. Tamamori, H. Fujisaki, M. Tanaka, M. Lin, H. Akimoto, F. Marumo, M. Hiroe, Mild hypoxia induces hypertrophy of cultured neonatal rat cardiomyocytes: a possible endogenous endothelin-1-mediated mechanism, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28 (1996) 1271–1277.
 - [19] C. Luberto, Y.A. Hannun, Sphingomyelin synthase, a potential regulator of intracellular levels of ceramide and diacylglycerol during SV40 transformation. Does sphingomyelin synthase account for the putative phosphatidylcholine-specific phospholipase C? *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 14550–14559.
 - [20] Y. Shirai, N. Saito, Activation mechanisms of protein kinase C: maturation, catalytic activation, and targeting, *J. Biochem.* 132 (2002) 663–668.
 - [21] R.H. Michell, The multiplying roles of inositol lipids and phosphates in cell control processes, *Essays Biochem.* 32 (1997) 31–47.
 - [22] E. Bligh, W. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911–917.
 - [23] I. Flores, A.C. Martinez, Y.A. Hannun, I. Merida, Dual role of ceramide in the control of apoptosis following IL-2 withdrawal, *J. Immunol.* 160 (1998) 3528–3533.
 - [24] G. Bartlett, Phosphorous assay in column chromatography, *J. Biol. Chem.* 234 (1958) 466–468.
 - [25] A. Nueda, M. Lopez-Cabrera, A. Vara, A.L. Corbi, Characterization of the CD11a (alpha L, LFA-1 alpha) integrin gene promoter, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 19305–19311.
 - [26] J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Laboratory Manual*, second ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
 - [27] M. Goldberg, H.L. Zhang, S.F. Steinberg, Hypoxia subcellular distribution of protein kinase C isoforms in rat ventricular myocytes, *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 55.
 - [28] K. Yoshioka, S. Clejan, J.W. Fisher, Activation of protein kinase C in human hepatocellular carcinoma (HEP3B) cells by erythropoietin production, *Life Sci.* 63 (1998) 523–533.
 - [29] J. Ito, Y. Nagayasu, S. Ueno, S. Yokoyama, Apoptosis-mediated cellular lipid release requires repletion of sphingomyelin in a phosphatidylcholine-specific phospholipase C-dependent manner, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 4470.
 - [30] R.J. Smith, L.M. Sam, J.M. Justen, G.L. Bundy, G. Bleasdale, Receptor-coupled signal transduction in human neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell response, *Pharmacol. Exp. Ther.* 253 (1990) 688–697.
 - [31] L.M. Broad, T.R. Cannon, C.W. Taylor, A non-calcium pathway activated by arachidonic acid is the major mechanism in rat A7r5 smooth muscle cells stimulated by concentrations of vasopressin, *J. Physiol.* 517 (1999) 11.
 - [32] L.M. Broad, F.J. Braun, J.P. Lievreumont, G.S. Bird, J.W.J. Putney, Role of the phospholipase C-induced trisphosphate pathway in calcium release-activated current and capacitative calcium entry, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 15945–15952.
 - [33] E.J. Yeo, J.H. Exton, Stimulation of phospholipase C by epidermal growth factor requires protein kinase C α in Swiss 3T3 cells, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 3980–3988.
 - [34] A. Gashler, V.P. Sukhatme, Early growth response protein 1: prototype of a zinc-finger family of transcription factors, *Nucleic. Acid Res. Mol. Biol.* 50 (1995) 191–224.
 - [35] A.S. Andrew, L.R. Klei, A. Barchowsky, Nickel requirement for inducible factor-1a, not redox signaling, to induce activator inhibitor-1, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 281 (2001) L607–L615.
 - [36] A. Gysembergh, A. Zakaroff-Girard, J. Loufoua, L. Andre-Fouet, M. Lagarde, A.F. Prigent, M. Ovize, F. Durr, Ischemia alters diacylglycerol content and metabolism in rabbit heart, *Basic Res. Cardiol.* 95 (2000) 457–466.
 - [37] S.F. Yan, J. Lu, Y.S. Zou, W. Kiesel, N. Mackman, S.F. Steinberg, D. Pinsky, D. Stern, Protein kinase C- β depletion. A novel Egr-1-dependent pathway for fibrosis in hypoxic vasculature, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 11928.
 - [38] E.L. Page, G.A. Robitaille, J. Pouyssegur, D.E. Richardson, Hypoxia-inducible factor 1 α by transcriptional mechanisms, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 48403–48414.

of Iron (II)-2-Oxoglutarate-dependent Dioxygenases in the eration of Hypoxia-induced Phosphatidic Acid through 1/2 and von Hippel-Lindau-independent Mechanisms*

Received for publication, September 26, 2003, and in revised form, December 12, 2003
Published, JBC Papers in Press, December 17, 2003, DOI 10.1074/jbc.M310658200

Silvia Martín-Puig†§, Elisa Temes†¶, Gemma Olmos‡, David R. Jones**, Julián Aragonés††§§, and Manuel O. Landázuri††¶¶

From the Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Diego de León, 62, 28006, Madrid, Spain

Hypoxia-inducible factors (HIF-1/HIF-2) govern the expression of critical genes for cellular adaptation to low oxygen tensions. We have previously reported that the cellular level of phosphatidic acid (PA) rises in response to hypoxia (1% O₂). In this report, we have examined whether components of the canonical HIF/von Hippel-Lindau (VHL) pathway are involved in the induction of PA. We found that hypoxia induces PA in a cell line stably expressing a stable version of HIF-1 α . PA accumulation was also found in HIF-1 α - and 2 α -negative CHO cells, as well as in HIF- β -negative HepaC4 cells. Our data indicate that HIF activity is neither sufficient nor necessary for oxygen-dependent PA accumulation. Induction of PA was also detected in cells deficient for the tumor suppressor VHL, indicating that the presence of VHL is not required for the induction of PA. Here we report that PA accumulation also occurs at moderate hypoxia (5% O₂), although to a lesser extent than that seen at 1% O₂, revealing that PA is induced at the same hypoxia level required to activate HIF-1. Prolyl hydroxylase and asparaginyl hydroxylase (FIH) belong to the iron (II)-2-oxoglutarate-dependent dioxygenase family and have been proposed as oxygen sensors involved in the regulation of HIFs. Chemical inhibition of these activities with iron chelators or 2-oxoglutarate analogs also results in a marked PA accumulation similar to that observed in hypoxia. Together these data show that PA accumulation in response to hypoxia is both HIF- and VHL-independent and indicate a role of iron (II)-2-oxoglutarate-dependent dioxygenases in the sensing mechanisms involved in hypoxia-driven lipid regulation.

Conditions ranging from severe to moderate oxygen supply deficiency (hypoxia) to tissues occurs under different pathological conditions (1, 2). Cells trigger a compensatory response that is critical for cellular survival under these lowered oxygen conditions (3, 4). The best characterized response to hypoxia is the induction of HIF¹ transcription factors (5) that control oxygen-dependent induction of a series of genes including those encoding the vascular endothelial growth factor (VEGF), erythropoietin (EPO), and glycolytic enzymes (6, 7) among others. HIFs are heterodimers composed of α and β subunits, which belong to the basic helix-loop-helix PAS (Per, Arnt, Sim) family of transcription factors (8). The β subunit, also known as the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT, is constitutively expressed, while the α subunit is tightly oxygen-regulated. There are three types of α subunits, HIF-1 α , HIF-2 α (endothelial PAS domain; EPAS), and HIF-3 α (9), encoded by different genes. In normoxia, the α subunits of HIF are very unstable proteins since they interact with the tumor suppressor von Hippel-Lindau (VHL) (10), which is a component of the E3 ubiquitin ligase complex (11) that leads to ubiquitination and subsequent proteasome-dependent degradation of HIF α subunits (12, 13). VHL recognizes HIF α subunits through two independent sites that contain the common motif LXXLAP present in both HIF-1 α and HIF-2 α (12). It has been recently demonstrated that hydroxylation of specific proline residues (underlined) into this conserved box is required for the interaction of VHL with HIFs (14, 15). A novel family of mammalian proline hydroxylases: PHD1, PHD2, and PHD3, which belong to the iron (II)-2-oxoglutarate-dependent dioxygenase family, have been involved in the hydroxylation of HIF proline residues (14, 16, 17). In the absence of oxygen, these post-translational modifications do not occur; pVHL cannot recognize HIF α subunits and as a consequence, HIF is acutely induced. Thus, under hypoxia, HIF α proteins are accumulated, migrate to the nucleus, associate with β subunits, and lead to the subsequent formation of the HIF-1 α / β and HIF-2 α / β heterodimers that bind to DNA at the specific HRE (hypoxia response elements) of different genes (18). More recently it has been reported that hypoxia-dependent transactivation activity of HIFs is controlled by hydroxylation of an asparaginyl residue in the C-terminal transactivation domain. FIH has been identified as the asparaginyl hydroxylase involved in this hydroxylation (19, 20). Therefore PHDs and FIH have been

This work was supported by grants from the Fondo de Investigaciones Científicas (CO3/01), and from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (2001-0215). The costs of publication of this article were in part by the payment of page charges. This article must be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC 1734 solely to indicate this fact.

*Authors contributed equally to this work.

†Supported by a graduate fellowship from Instituto de Salud Carlos III.

‡Supported by a graduate fellowship from Fondo de Investigaciones Científicas.

§Supported by the Spanish Cardiovascular Network.

¶Present address: Division of Cellular Biochemistry, The Netherlands Institute Plesmanlaan 121.1066 CX Amsterdam, The Netherlands.

§§Authors contributed equally to this work.

¶¶Present address: Center for Transgene Technology and Gene Therapy, KU Leuven Campus Gasthuisberg O&N, Herestraat 49, 3000 Leuven, Belgium.

Correspondence should be addressed. Tel.: 34-91-5202374; Fax: 34-91-5202374; E-mail: mortiz.hlpr@salud.madrid.org.

¹ The abbreviations used are: HIF, hypoxia-inducible factor; VHL, von Hippel-Lindau; PHD, prolyl hydroxylase domain; HRE, hypoxia response element; FIH, factor-inhibiting HIF; PA, phosphatidic acid; Df, deferoxamine; DMOG, dimethyl oxalylglycine; 3,4-DHB, ethyl 3,4-dihydroxybenzoate; L-mim, L-mimosine; CHO, Chinese hamster ovarian cells; Hx, hypoxia; Nx, normoxia.

Oxygen-sensing Mechanisms Involved in PA Induction by Hypoxia

named as HIF hydroxylases and have been proposed as the oxygen sensors that control HIF activity (21–23).

In order to respond to multiple extracellular stimuli, cells often generate lipid second messengers (24). Phosphatidic acid (PA) has been proposed as one of these intracellular second messengers (25) and has been suggested to participate in different cellular events such as cell proliferation and actin polymerization (26–29) as well as in inflammatory responses and cytokine secretion (30). PA has also been implicated to modulate the activity of numerous enzymes such as Raf kinase (31, 32), protein phosphatase I (33), as well as the mammalian target of rapamycin, mTOR (34).

We have previously observed that hypoxia (1% O₂) leads to an increase in the intracellular PA level, most probably through the action of a DGK activity (35). In this work we have characterized the oxygen-dependent mechanisms involved in the generation of PA induced after oxygen deprivation. Here we show that hypoxia-dependent PA accumulation does not require the activity of HIF-1 nor HIF-2 transcription factors or that of VHL. Moreover, we also provide evidence for the role of iron (II)-2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in oxygen mechanisms involved in PA generation by low oxygen tension.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents—[³²P]Orthophosphate (carrier-free) was purchased from Amersham Biosciences. Silica gel thin layer chromatography plates (60 Å, LK6D) were from Whatman (Clifton, NJ). The authentic phospholipid standards 1,2-dioleoylglycerol and 1,2-dioleoylphosphatidic acid were from Sigma. Analytic grade organic solvents for TLC were from Merck (Darmstadt, Germany). Minimum essential medium without phosphate was from ICN Biomedicals (Aurora, OH). Antibodies were obtained from the following sources: monoclonal HIF-1α (Transduction Laboratories), monoclonal HIF-1α (Calbiochem), monoclonal HIF-2α (EPAS) (Novus Biologicals), polyclonal HIF-2α (EPAS) (Novus Biologicals), and monoclonal pVHL (Transduction Laboratories). Horseradish peroxidase-coupled sheep anti-mouse antibody was from Pierce. Deferoxamine (Df), cobalt chloride (CoCl₂), L-mimosine (L-mim), and ethyl 3,4-dihydroxybenzoate (3,4-DHB) were from Sigma, and dimethyl oxalylglycine (DMOG) was synthesized by Dr. Imre Schlemminger and kindly provided by Dr. Maxwell (Imperial College London).

Cell Culture, Cell Treatments, and Hypoxic Conditions—Human embryonic kidney cells 293-T, as well as UMRC cells (36) and 786-O (37), derived from human renal carcinomas were grown in RPMI 1640 medium with GLUTAMAX-1 (Invitrogen, Life Technologies Ltd.). The 786-O-PP13 clone was derived from 786-O-WT8 cells upon stable expression of P402A, P564G mutant HIF-1, and grown in the presence of hygromycin B (Roche Applied Science). HeLa cells were grown in Dulbecco's minimal essential medium (Biochrom KG, Berlin, Germany). CHO 4.5 and Ka13 cells (38) were grown in Ham's Nutrient Mixture F-12 (Euroclone); Hepa C1 and C4 cells were maintained in α-modified Eagle's medium αMEM (Biochrom). All the cells were cultured in the presence of 10% (v/v) fetal calf serum (Labtech International Ltd., Woodside, UK). Cells were routinely cultured in 95% air, 5% CO₂ (normoxic conditions) at 37 °C. To expose cells to hypoxia, they were placed into an airtight chamber with inflow and outflow valves that were infused with a mixture of 1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂ (S. E. Carburos Metalicos S. A., Madrid, Spain) or placed in an *in vivo* 400 hypoxia workstation (Ruskin Technology, West Yorkshire, UK). In all experiments, cells were plated at 70–90% confluence, and when completely attached they were exposed to normoxia or hypoxia. In those experiments in which inhibitors were used, these compound were added 30 min before other treatments.

Measurement of [³²P] Phosphatidic Acid—Cells were cultured in phosphate-free medium supplemented or not with 10% (v/v) fetal calf serum (extensively dialyzed against 0.9% (w/v) NaCl) for 90 min before the addition of [³²P]orthophosphate (100 μCi/ml) for an additional 90 min. Thereafter, the cells were exposed to normoxia or hypoxia. Phospholipids were then extracted by the method of Bligh and Dyer (39) and analyzed as previously described (35). Quantification of the band corresponding to [³²P]PA was performed using the Image Reader v1.8 software (Science Lab software, Fuji Photo Film).

Transient Transfection and Luciferase Assays—Ka13 cells were transfected with 3.3 μg of expression plasmid for HIF-1α or pcDNA3 without the insert in the presence of 0.4 μg of the reporter plasmid

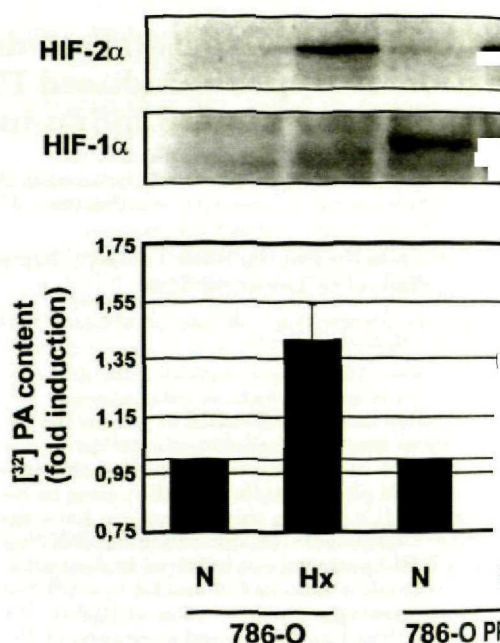


Fig. 1. HIF-1α is not sufficient to induce PA accumulation. 786-O and 786-O-PP13 cells were incubated for 5–6 h in hypoxia (1% O₂) or normoxia (N). HIF-1/2 α levels were determined by Western blotting (top panels) as indicated under “Experimental Procedures.” anti-α-tubulin protein antibody was used as a loading control (not shown). In parallel experiments, we analyzed PA content in [³²P]orthophosphate metabolically labeled cells. Total cellular lipids were extracted and separated by TLC. [³²P]-Radiolabeled lipids were visualized by autoradiography and the amount of PA was normalized to the total [³²P]-labeled material. We assigned the value of 1 to the total PA level of the normoxic control cells. Each bar represents average PA fold induction over normoxia from three independent experiments performed in duplicate or triplicate (bottom panel).

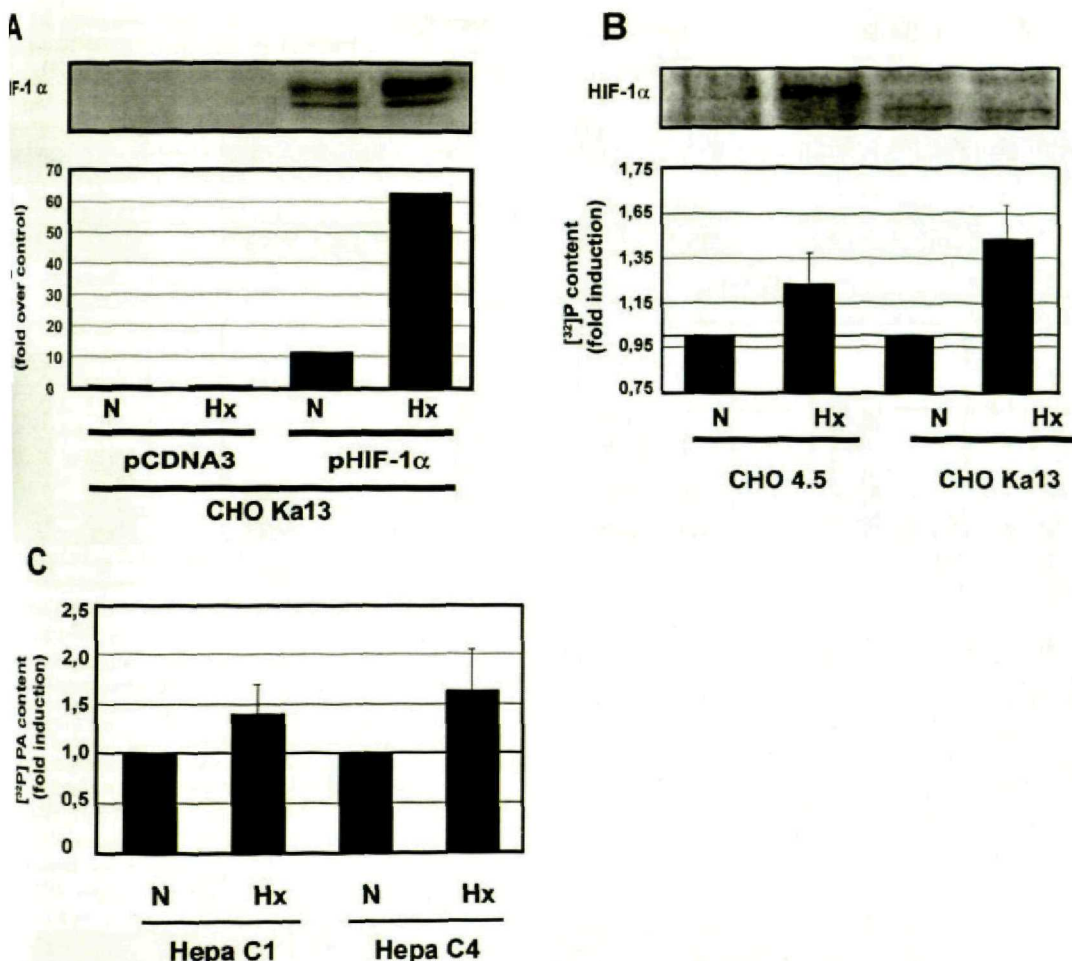
p9HIF1-Luc (35) and 0.3 μg of pRLTK (Promega). Transfection was performed using Lipofectin (Invitrogen). 7–8 h after transfection, cells were split into the appropriate number of wells (35-mm plates). 12 h of expression, the cells were incubated under either normoxia or hypoxic 1% O₂ conditions for 5–6 h. Finally, cells were harvested for Western blot assays as well as luciferase assays were performed. Firefly and *Renilla* luciferase activities were determined using a dual luciferase system (Promega), and firefly luciferase activity was normalized based on the *Renilla* luciferase activity.

Western Blotting—Proteins from total cell lysates were separated on 8–10% polyacrylamide-SDS gel. Proteins were then transferred to nitrocellulose membrane (Bio-Rad), blocked with 5% nonfat dry milk in TBST (50 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20), probed overnight at 4 °C with the indicated antibodies. Immunoreactivity was detected by enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) and visualized with a digital luminescent imager (FUJIFILM LAS-1000 CH).

RESULTS

PA Generation Induced by Hypoxia Is HIF-1/2-dependent—We have previously reported that hypoxia (1% O₂) induces PA accumulation in different cell types (35). The fact that oxygen tension induces both PA accumulation and HIF-1 protein stabilization raised the possibility that the intracellular PA increment depends on HIF activation after exposure to hypoxia. To assess this possibility, we used the 786-O-PP13 clone, which constitutively expresses HIF-1α protein, while 786-O cells derive from the wild-type 786-O, that express HIF-1α protein but not HIF-1α (Fig. 1, top panel), by stable transfection of a constitutively stabilized version of HIF-1 at the 402 and 564 proline residues. This construct is constitutively stabilized, because it cannot be hydroxylated by HIF hydroxylases, and therefore VHL

Oxygen-sensing Mechanisms Involved in PA Induction by Hypoxia



Functional HIF activity is not required for PA accumulation by hypoxia. A, CHO Ka13 cells were transiently transfected with HIF-1α expression plasmid (pHIF-1α) or with the empty vector (pCDNA3) in the presence of the reporter plasmids p9HIF-1 Luc and subsequently exposed to hypoxia (Hx, 1% O₂) or left at normoxia (N) for 5–6 additional hours. HIF-1α exogenous protein level was determined by Western blot assay (top panel), and luciferase activity was analyzed and normalized by Renilla activity in each case. We assigned a value of 1 to the control normoxic cells and the rest of samples were represented as fold over the control. One experiment representative of three independent experiments is shown (bottom panel). B, [32P]orthophosphate metabolically labeled CHO 4.5 and CHO Ka13 cells were exposed to hypoxia (Hx, 1% O₂) for 5–6 h or left in normoxia (N) for the same period of time. The endogenous level of HIF-1α protein was determined by Western blotting as a control of hypoxia stimulation (top panel). We analyzed the PA content (bottom panel) as described in Fig. 1. Each bar represents the PA fold induction (mean ± S.D.) over normoxia from three independent experiments performed in triplicate. C, Hepa C1 and Hepa C4 cells were [32P]orthophosphate metabolically labeled and exposed to hypoxia (Hx, 1% O₂) for 5–6 h or maintained at normoxia (N). Cellular PA content was determined by thin layer chromatography and scintillation counter as described above. Each bar represents the PA fold induction (mean ± S.D.) from three independent experiments performed in triplicate. Hypoxia stimulation was controlled by Western blotting against HIF-1α (data not shown).

the this protein. This clone expresses HIF-dependent transcriptional activity despite the oxygen concentrations (40). To rule out the possibility that this cell line has constitutively elevated PA levels, we determined the PA content in these cells. We found that 786-O as well as the mutated version 786-O-PP13 had similar PA basal levels (data not shown), and both were able to induce PA in response to hypoxia (Fig. 1, bottom panel). From these results we can conclude that HIF-1α stabilization *per se* is not sufficient to induce PA accumulation.

To further study whether PA induction depends on HIF activity, we decided to use the previously described CHO 4.5 cell line, that does not express HIF-2α and the CHO Ka13, derived from CHO 4.5 by mutagenesis and which also lacks HIF-1α expression (Fig. 2B, top panel). Therefore CHO Ka13 cells do not exhibit inducible HRE-dependent transcriptional activity (38). However, the oxygen-sensing mechanisms involved in the induction of HIF are functional in these cells, since an exogenously

transfected HIF-1α subunit is regulated by hypoxia (Fig. 2A, top panel) and is able to drive the transcription of an HRE-linked reporter plasmid (Fig. 2A, bottom panel). Importantly, we found that exposure of the Ka13, as well as the parental cell line 4.5, to hypoxia (1% O₂) results in an increase in the level of PA (Fig. 2B) despite the lack of HIF-1/2. In addition, we also utilized the widely used HepaC4 cells, that do not express a functional HIFβ subunit, in contrast to the parental HepaC1 cells, and as a consequence, HIF proteins are not able to transactivate target genes (41, 42). Here we found that PA was also induced in response to hypoxia in both cell lines (Fig. 2C). Together all the data indicated that neither HIF-1 nor HIF-2 factors are necessary for PA accumulation by hypoxia.

VHL Function Is Not Required for PA Induction in Response to Hypoxia—Since VHL plays a critical role in the canonical oxygen-sensing pathway, we investigated its role in hypoxia-

Oxygen-sensing Mechanisms Involved in PA Induction by Hypoxia

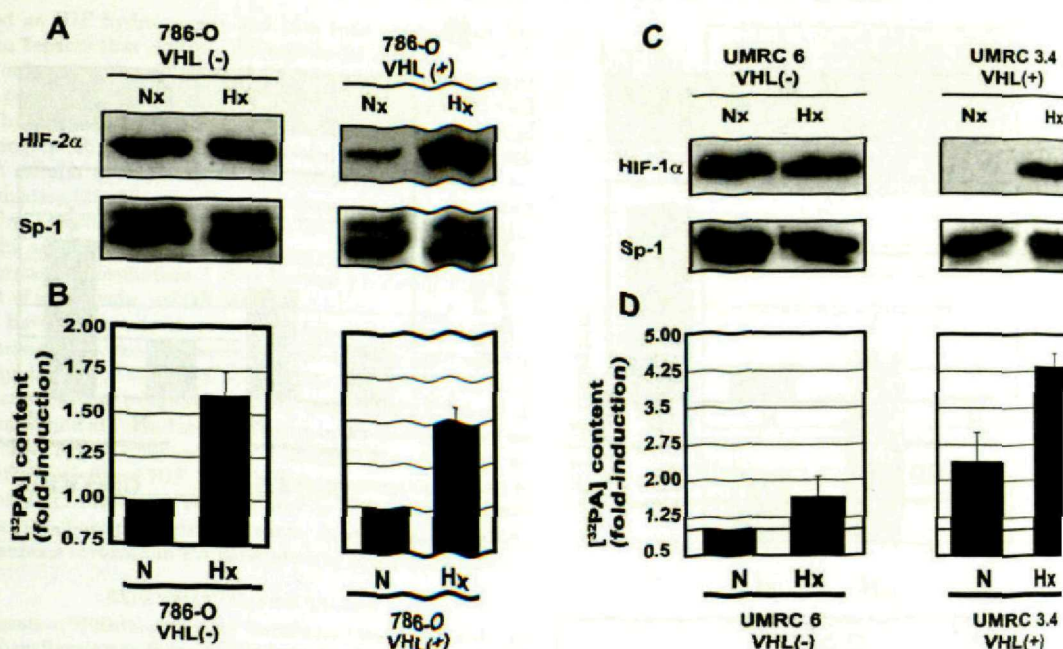


FIG. 3. Hypoxia increases the intracellular level of PA in VHL-deficient cells. 786-O (A) and UMRC (C) cells were exposed to hypoxia (1% O₂) or maintained in normoxia (N) for 5–6 h. The levels of HIF-1α/2α protein were determined by Western blotting. The membrane was probed with an anti Sp1 protein antibody as a loading control. Here we show the results from one experiment representative of two additional experiments. 786-O (B) and UMRC (D) VHL (+) or VHL (-) cells were [³²P]orthophosphate metabolically labeled and incubated for 5–6 h in hypoxia (Hx) or normoxia (N). Then the [³²P]-radiolabeled PA content was quantified relative to the total amount of labeled material. In panel B, the value of 1 to the normalized PA level of the normoxic control of the corresponding cells. Each bar represents the PA fold induction (mean ± S.D.) of three independent experiments performed in duplicate or triplicate. In panel D, we assigned the value 1 to the normalized PA level of normoxic UMRC6 VHL (-) cells. In this case, each bar represents the PA fold induction (mean ± S.D.) over the control above. Two experiments performed in duplicate are shown.

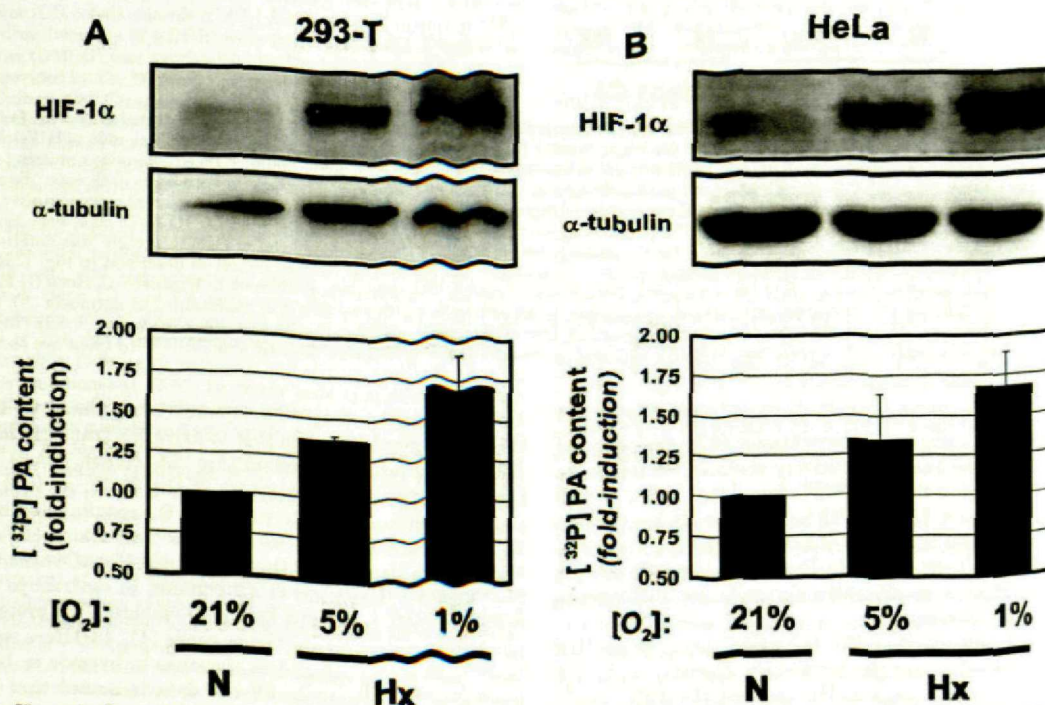


FIG. 4. Hypoxia-dependent PA accumulation is sensitive to changes in oxygen tension. 293-T (A) and HeLa (B) cells were exposed to hypoxia (Hx) at 1 and 5% oxygen concentrations or left at normoxia (N, 21% O₂) for 5–6 h. In parallel experiments HIF-1α levels were determined by Western blot from non-radiolabeled cells as indicated under "Experimental Procedures." An anti-α-tubulin protein antibody was used as a loading control. The results of one experiment are shown. A further experiment gave identical results (A and B, top panels). PA content was analyzed as described in Fig. 1. Each bar represents the average PA fold induction over normoxia from two independent experiments performed in duplicate (A and B, bottom panels).

Oxygen-sensing Mechanisms Involved in PA Induction by Hypoxia

ed PA elevation. For this purpose, we used the previously described UMRC (36) and 786-O (37) cell lines, which have a *vhl* tumor suppressor gene. The major HIF isoform expressed by UMRC cells is 1 α , whereas the 786-O cell line expresses mainly HIF-2 α (data not shown). The absence of results in a constitutive accumulation of HIF factors in UMRC (13, 36), which was not further increased upon hypoxia (Fig. 3, A and C). Interestingly, we found a constitutive intracellular PA induction by hypoxia in both cell lines regardless of the presence or absence of VHL (Fig. 3, B and C). These results indicate that the presence of VHL is not required for hypoxia-dependent PA accumulation. It is important to note that in the case of UMRC6 VHL (-) cells, which express HIF-1 α protein that is completely stabilized (Fig. 3C), the basal level was significantly lower than that in VHL (+) cells (Fig. 3D). These data support our conclusion above, suggesting that HIF activation is neither sufficient nor necessary for hypoxia-induced PA accumulation. Together the experiments described so far indicate that HIF-1/2 nor VHL are involved in the induction of PA accumulation by hypoxia.

PA Accumulation Is Induced by Moderate Hypoxia—Since we observed PA accumulation at hypoxia (1% O₂) and we and other investigators (35, 43) could observe HIF-1 α stabilization at oxygen tensions ranging from 1 to 5% O₂ (Fig. 4, top panels), we wanted to analyze whether hypoxia-induced PA accumulation occurred at this range of oxygen tension. For this purpose, we used [³²P]orthophosphate metabolically labeled 293-T cells to 1 and 5% oxygen concentrations. As shown in Fig. 4 (bottom panels), the accumulation of PA was detected in both hypoxic conditions in both cell lines. Importantly, we found that there was a good correlation between the levels of PA induced by different degrees of hypoxia, 1% O₂ and 5% O₂ (Fig. 4). These data suggest that the oxygen-sensing mechanisms controlling HIF-1 are involved in hypoxia-induced PA generation.

Induction of Iron (II)-2-Oxoglutarate-dependent Dioxygenases Induces PA Accumulation—HIF prolyl hydroxylases and HIF asparaginyl hydroxylase (FIH) are iron (II)-2-oxoglutarate-dependent dioxygenases previously proposed to act as oxygen sensors that directly govern HIF activity (14, 16). The similar oxygen dependence of PA induction and HIF protein stabilization, led us to ask whether cellular iron (II)-2-oxoglutarate-dependent dioxygenase activity could functionally regulate hypoxia-induced PA accumulation. First, we determined the intracellular PA level in the presence of the iron chelator deferoxamine (Df) and the transition metal cobalt chloride (CoCl₂), which are widely used as HIF activators. Both compounds are potent inhibitors of PHD and FIH because of their requirement of these enzymatic activities (21–23). As shown in Fig. 5, the treatment of 293-T cells with these compounds at the same concentration required to accumulate PA (top panel), was able to elevate the intracellular level of PA (bottom panel). These results indicate that these compounds mimic hypoxia not only by their positive effect upon HIF expression, but also by increasing the level of intracellular PA.

In addition to iron and oxygen, the above mentioned family of dioxygenases also requires 2-oxoglutarate to catalyze the hydroxylation reaction. Therefore, to further investigate the position of these enzymes in PA accumulation, we used a structurally distinct 2-oxoglutarate analogs previously described. As shown in Fig. 6A, treatment of 293-T cells with dimethylallylglycine (DMOG) (16), increased HIF-1 α protein (top panel), and the same doses induced PA accumulation (bottom panel). To support these data we also used the known

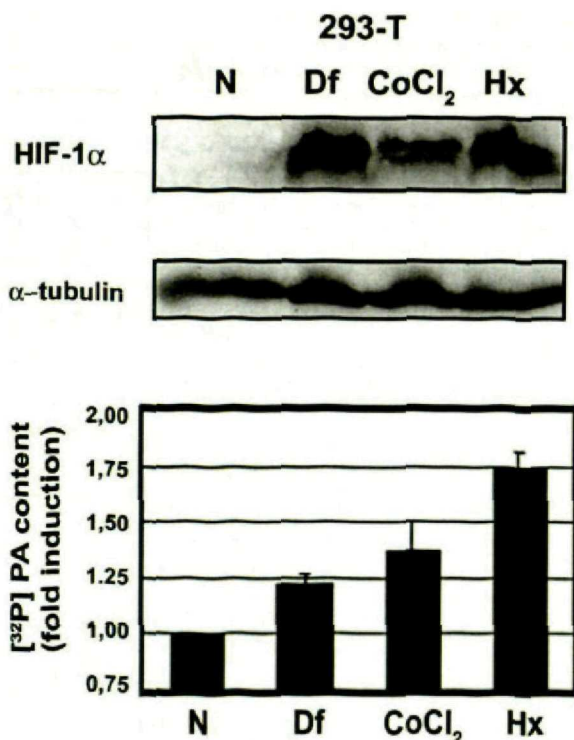


FIG. 5. Hypoxia mimetic agents, deferoxamine, and cobalt chloride induce PA accumulation. 293-T cells were stimulated with deferoxamine (Df) (380 μ M), cobalt chloride (CoCl₂) (100 μ M) and hypoxia (Hx, 1% O₂) or left at normoxia (N) during 6 h. After that, HIF-1 α level was determined by Western blot. As a loading control the membrane was probed with an anti α -tubulin protein antibody. Here we show one representative experiment of three (top panel). In parallel, [³²P]orthophosphate metabolically labeled 293-T cells were treated as indicated above, for 5 h. Cellular phospholipids extraction and PA analysis were performed as described in previous figures. Each bar represents the PA fold induction (mean \pm S.D.) from three independent experiments performed in duplicate (bottom panel).

dioxygenases inhibitors L-mim (44) and 3,4-DHB (45). It has been recently described that exposure of cells to these compounds induces HIF-1 α protein since they are 2-oxoglutarate analogs (46). 293-T cells treated with 3,4 DHB or L-mim stabilized the HIF-1 α subunit in a dose-dependent manner (Fig. 6, B and C, top panels). Importantly, a parallel increase in the PA level was also observed (Fig. 6, B and C, bottom panels). Therefore we conclude that chemical inhibition of iron (II)-2-oxoglutarate-dependent dioxygenase activity mimic hypoxia-driven PA generation. These findings and the fact that the generation of PA occurs at the same oxygen tensions that activate HIF-1 (see Fig. 4), led us to propose that HIF hydroxylases or other iron (II)-2-oxoglutarate-dependent dioxygenases with similar oxygen sensitivity are involved in PA accumulation after oxygen deprivation.

DISCUSSION

We have previously reported that hypoxia-induced PA accumulation is involved in HIF-1 expression (35). This fact led us to hypothesize that oxygen-sensing mechanisms involved in PA accumulation are upstream and independent of HIF-1 activation. Here we have probed our speculation using different approaches. First we found that the expression of a stably version of HIF-1 α (786-O-PP13) did not trigger PA induction. Second, the PA increase occurred in the absence of HIF-1 and HIF-2 expression in Ka13 cells as well as in Hepa C4. Third, in VHL-

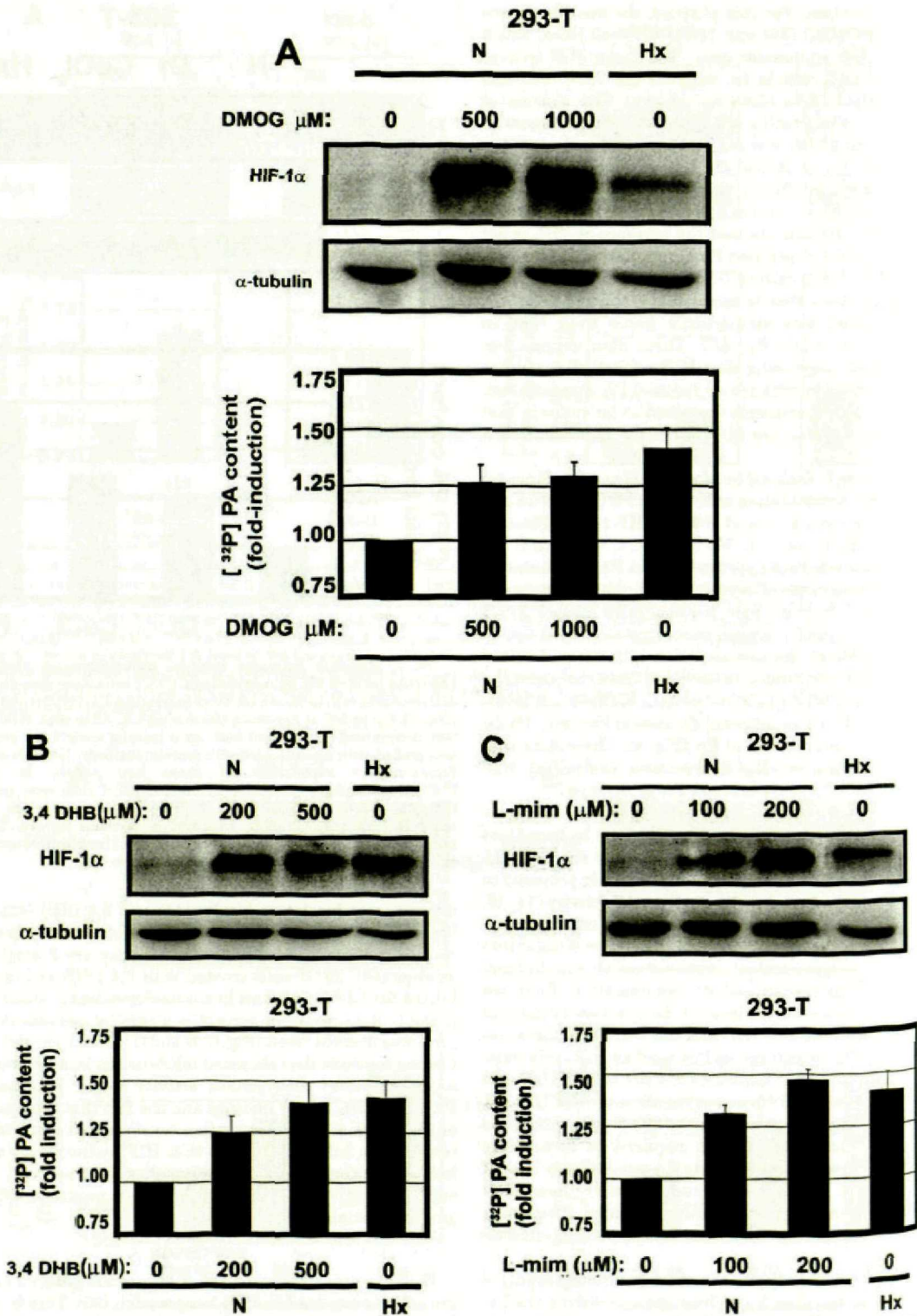


FIG. 6. Dioxygenases inhibitors, dimethyl oxalylglycine, ethyl 3,4-dihydroxybenzoate, and L-mimosine, induce PA. (A) 293-T cells were treated with dimethyl oxalylglycine (DMOG) 500 μ M, 1000 μ M, or vehicle (H_2O , 0) (A), with ethyl 3,4-dihydroxybenzoate (3,4-DHB) 200 μ M, 500 μ M, or vehicle (ethanol, 0) (B), or stimulated by hypoxia (Hx) exposure for 5 h. 293-T cells were also treated in the same experiments with L-mim at 100 μ M, 200 μ M, or vehicle (ammonium hydroxide, 0) (C). The HIF-1 α level was detected by immunoblot. The membranes were probed with an anti α -tubulin protein antibody as a loading control. One of four similar experiments is shown. Bottom panels, 293-T cells were metabolically labeled with [32 P]orthophosphate and treated in parallel with cells above, at the indicated doses of all the stimuli. PA content was determined by HPLC as before. Each bar represents the PA fold induction (mean \pm S.D.) from four (DMOG, 500 μ M and L-mim) or five (DMOG, 1000 μ M, 3,4-DHB, and Hx) independent experiments.

Oxygen-sensing Mechanisms Involved in PA Induction by Hypoxia

ve cells, which have constitutive HIF activity, we did not see a constitutively elevated PA level. Moreover, unlike PA was induced by hypoxia in VHL-deficient cells. These results reveal the existence of HIF-1/2- and VHL-independent mechanisms involved in PA generation upon cellular exposure to hypoxia.

Our findings are in agreement with previous reports indicating the existence of several hypoxia-induced processes that are independent of HIF. Some of these events are the hypoxia-driven induction of heme oxygenase-1 expression (38, 47), phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α (48), ion channel regulation (49), down-regulation of mammalian target of rapamycin mTOR and its targets (50), as well as the induction of EGR gene expression (51), which are not impaired in HIF-deficient cells, such as Ka13 or Hepa C4, which are widely used as models to demonstrate HIF-independent processes (47, 52).

Because of the existence of these HIF-independent mechanisms in response to hypoxia and the role of PA as intracellular messenger, our data raise the question of whether hypoxia-induced PA accumulation may have a role, not only on HIF activation (35) but also on other HIF-independent processes triggered by hypoxia. Particularly interesting cases are those of Raf-1, previously identified as intracellular targets of HIF. In this regard it has been reported that PA generation in response to hypoxia plays a role in the regulation of these intracellular kinases (31, 32, 34). There are several reports indicating the regulation of mTOR activity in response to hypoxia (50, 54, 55). The possibility that hypoxia-induced PA accumulation could be involved in the regulation of mTOR should be considered. Moreover Raf-1 has been described to be activated by hypoxia in endothelial cells (56), indicating the possibility that PA could also be mediating this induction. Therefore, our experiments will be designed to answer the question of whether PA generated in hypoxia constitutes a key intracellular regulator of certain hypoxia-induced processes. Because the therapeutic approaches against pathological hypoxia are based on HIF, the study and characterization of parallel and independent pathways will be of great interest.

Hydroxylases (PHDs and FIH) have been proposed as sensors involved in the regulation of HIF transcription (21–23). The use of previously recognized inhibitors of hydroxylase activities result in a strong induction of PA (46, 48). Here we found that cellular exposure to variable levels of these inhibitors are able to induce HIFs and also PA in marked PA generation. These data suggest that inhibition and subsequent inhibition of hydroxylase activity lead to PA accumulation. In addition, the fact that PA is modulated by oxygen tension (see Fig. 4), suggests that PA is a possible candidate to account for this PA accumulation. The HIF hydroxylases (PHD and/or FIH), since they are more sensitive to small changes in O₂ than other iron-dependent dioxygenases (57). However, our results do not exclude the possibility that other members of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases family, different from PHD or FIH, could be involved in PA induction by hypoxia. Further analysis is required to fully determine the involvement of these enzymatic activities on PA generation by hypoxia.

Our data also suggest that the cellular mechanisms involved in hypoxia-induced PA generation are putative new targets for 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases. We could not suggest that enzymatic activities involved in PA metabolism could be regulated by these novel post-translational modifications. This possibility could extend the range of effects induced by iron (II)-2-oxoglutarate-dependent dioxygenases

after exposure to hypoxia in an HIF-independent manner. Our results indicate that cellular hypoxia is not totally orchestrated by HIF transcription factors and lead us to hypothesize, for the first time, the existence of new targets for this novel family of dioxygenases that control PA generation in response to low oxygen tension.

Acknowledgments—We thank Dr. Imre Schlemminger for the synthesis of DMOG, Dr. Maxwell for reagents, Dr. Kaelin for kindly providing 786-O cells, Drs. Ivanov and Lerman for UMRC cells, and Dr. N. Masson for the HIF-1 α mutant construct. We also thank Dra. I. Mérida, Dr. L. Del Peso, Dra. M. C. Castellanos, Y. Cuevas, and S. Naranjo for critical reading of the article.

REFERENCES

- Ryan, H. E., Lo, J., and Johnson, R. S. (1998) *EMBO J.* **17**, 3005–3015
- Ryan, H. E., Poloni, M., McNulty, W., Elson, D., Gassmann, M., Arbeit, J. M., and Johnson, R. S. (2000) *Cancer Res.* **60**, 4010–4015
- Seta, K. A., Spicer, Z., Yuan, Y., Lu, G., and Millhorn, D. E. (2002) *Sci. STKE* **146**:RE11
- Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (2003) *Nat. Med.* **9**, 677–684
- Huang, L. E., and Bunn, H. F. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 19575–19578
- Wenger, R. H. (2000) *J. Exp. Biol.* **203**, 1253–1263
- Semenza, G. (2002) *Biochem. Pharmacol.* **64**, 993–998
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5510–5514
- Gu, Y. Z., Moran, S. M., Hogenesch, J. B., Wartman, L., and Bradfield, C. A. (1998) *Gene Expr.* **7**, 205–213
- Kaelin, W. G. J. (2002) *Nat. Rev. Cancer* **2**, 673–682
- Kamuro, T., Koepf, D. M., Conrad, M. N., Skowyr, D., Moreland, R. J., Iliopoulos, O., Lane, W. S., Kaelin, W. G. J., Elledge, S. J., Conaway, R. C., Harper, J. W., and Conaway, J. W. (1999) *Science* **284**, 657–661
- Huang, J., Zhao, Q., Mooney, S. M., and Lee, F. S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 39792–39800
- Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R., and Ratcliffe, P. J. (1999) *Nature* **399**, 271–275
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., and Kaelin, W. G. J. (2001) *Science* **292**, 464–468
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (2001) *Science* **292**, 468–472
- Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzger, E., Wilson, M. I., Dhanda, A., Tian, Y. M., Masson, N., Hamilton, D. L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Schofield, C. J., and Ratcliffe, P. J. (2001) *Cell* **107**, 43–54
- Bruick, R. K., and McKnight, S. L. (2001) *Science* **294**, 1337–1340
- Wenger, R. H. (2002) *Faseb J.* **16**, 1151–1162
- Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., White, M. F., and Bruick, R. K. (2002) *Genes Dev.* **16**, 1466–1471
- Mahon, P. C., Hirota, K., and Semenza, G. L. (2001) *Genes Dev.* **15**, 2675–2686
- Safran, M., and Kaelin, W. G. J. (2003) *J. Clin. Invest.* **111**, 779–783
- Zhu, H., and Bunn, H. F. (2001) *Science* **292**, 449–451
- Masson, N., and Ratcliffe, P. J. (2003) *J. Cell Sci.* **116**, 3041–3049
- Ghosh, S., Strum, J. C., and Bell, R. M. (1997) *Faseb J.* **11**, 45–50
- Hodgkin, M. N., Pettitt, T. R., Martin, A., Michell, R. H., Pemberton, A. J., and Wakelam, M. J. (1998) *Trends Biochem. Sci.* **23**, 200–204
- Cross, M. J., Roberts, S., Ridley, A. J., Hodgkin, M. N., Stewart, A., Claesson-Welsh, L., and Wakelam, M. J. (1996) *Curr. Biol.* **6**, 588–597
- Fukami, K., and Takenawa, T. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 10988–10993
- Ha, K. S., and Exton, J. H. (1993) *J. Cell Biol.* **123**, 1789–1796
- Kam, Y., and Exton, J. H. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4055–4066
- Lim, H. K., Choi, Y. A., Park, W., Lee, T., Ryu, S. H., Kim, S. Y., Kim, J. R., Kim, J. H., and Baek, S. H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 123–129
- Andersen, B. T., Rizzo, M. A., Shome, K., and Romero, G. (2002) *FEBS Lett.* **531**, 65–68
- Ghosh, S., Moore, S., Bell, R. M., and Dush, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 45690–45696
- Kishikawa, K., Chalfant, C. E., Perry, D. K., Bielawska, A., and Hannun, Y. A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 21335–21341
- Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanagan, A., and Chen, J. (2001) *Science* **294**, 1942–1945
- Aragones, J., Jones, D. R., Martin, S., San Juan, M. A., Alfranca, A., Vidal, F., Vara, A., Merida, I., and Landazuri, M. O. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 10548–10555
- Ivanov, S. V., Kuzmin, I., Wey, M. H., Pack, S., Geil, L., Johnson, B. E., Stanbridge, E. J., and Lerman, M. I. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 12598–12601
- Iliopoulos, O., Kibel, A., Gray, S., and Kaelin, W. G. (1995) *Nat. Med.* **1**, 822–826
- Wood, S. M., Wiesener, M. S., Yeates, K. M., Okada, N., Pugh, C. W., Maxwell, P. H., and Ratcliffe, P. J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 8360–8368
- Bligh, E., and Dyer, W. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917
- Del Peso, L., Castellanos, M. C., Temes, E., Martín-Puig, S., Cuevas, Y., Olmos, G., and Landazuri, M. O. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 48690–48695
- Wood, S. M., Gleadle, J. M., Pugh, C. W., Hankinson, O., and Ratcliffe, P. J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 15117–15123
- Maxwell, P. H., Dachs, G. U., Gleadle, J. M., Nicholls, L. G., Harris, A. L., Stratford, I. J., Hankinson, O., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (1997) *Proc.*

Oxygen-sensing Mechanisms Involved in PA Induction by Hypoxia

- Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 8104–8109
43. Wiesener, M. S., Turley, H., Allen, W. E., Willam, C., Eckardt, K. U., Talks, K. L., Wood, S. M., Gatter, K. C., Harris, A. L., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., and Maxwell, P. H. (1998) *Blood* **92**, 2260–2268
44. McCaffrey, T. A., Pomerantz, K. B., Sanborn, T. A., Spokojny, A. M., Du, B., Park, M. H., Folk, J. E., Lamberg, A., Kivirikko, K. I., Falcone, D. J., Mehta, S., and Hanauske-Abel, H. M. (1995) *J. Clin. Invest.* **95**, 446–455
45. Majamaa, K., Gunzler, V., Hanauske-Abel, H. M., Myllyla, R., and Kivirikko, K. I. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 7819–7823
46. Warnecke, C., Griethe, W., Weidemann, A., Jurgensen, J. S., Willam, C., Bachmann, S., Ivashchenko, Y., Wagner, I., Frei, U., Wiesener, M., and Eckardt, K. U. (2003) *Faseb J.* **17**, 1186–1188
47. Gong, P., Hu, B., Stewart, D., Ellerbe, M., Figueroa, Y. G., Blank, V., Beckman, B. S., and Alam, J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 27018–27025
48. Koumenis, C., Naczki, C., Koritzinsky, M., Rastani, S., Diehl, A., Sonenberg, N., Koromilas, A., and Wouters, B. G. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7405–7416
49. Lopez-Barneo, J., Pardal, R., Montoro, R. J., Smani, T., Garcia-Hirschfeld, J., and Urena, J. (1999) *Respir. Physiol.* **115**, 215–227
50. Arsham, A. M., Howell, J. J., and Simon, M. C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 29655–29660
51. Yan, S. F., Lu, J., Zou, Y. S., Soh-Won, J., Cohen, D. M., Buttrick, D. R., Steinberg, S. F., Mackman, N., Pinsky, D. J., and S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 15030–15040
52. Gassmann, M., Kvietikova, I., Rolfs, A., and Wenger, R. H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 567–574
53. Hofbauer, K. H., Gess, B., Lohaus, C., Meyer, H. E., Katschina, K., Kurtz, A. (2003) *Eur J Biochem.* **270**, 4515–4522
54. Humar, R. K. F., Berns, H., Resink, T. J., and Battagay, E. J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 771–780
55. Hudson, C. C., Liu, M., Chiang, G. G., Otterness, D. M., Loomis, D. F., Giaccia, A. J., and Abraham, R. T. (2002) *Mol. Biol. Cell* **22**, 4515–4522
56. Jung, F., Haendeler, J., Hoffmann, J., Reissner, A., Dermbach, A. M., and Dimmeler, S. (2002) *Circ. Res.* **91**, 38–45
57. Hiraila, M., Koivunen, P., Gunzler, V., Kivirikko, K., and Myllyharju, J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 30772–30780

ANEXO II

Manuscrito en preparación.

**R59949 THE FIRST ACTIVATOR OF HIF-HYDROXYLASES: NEW
INSIGHTS FOR CANCER THERAPY.**

**E. Temes, S. Martín-Puig, B. Acosta, María C. Castellanos, J. Aragonés and Manuel O.
Landázuri.**

Summary

Hypoxia-inducible factors (HIF) are the critical transcription factors for cellular adaptation to low oxygen tensions. We have previously reported that hypoxia-induced HIF protein accumulation is dramatically inhibited after treatment with the specific DGK inhibitor R59949. Considering the effects of HIF expression and activation on tumor progression and resistance to cancer treatment, the characterization of novel HIF-inhibitors is of critical importance. In the present work we have studied in deep detailed the effect of R59949 upon HIF regulation pathway. Here we show that R59949 inhibited HIF-1/2 protein level without affecting their mRNAs. We have also determined that VHL protein presence was required by R59949 to block HIF accumulation. These results agree with our following observation that VHL binding to endogenous HIF was significantly enhanced after R59949 treatment even upon hypoxic conditions. In addition, we found that R59949 was able to stimulate prolyl hydroxylase (PHD) activity at 21% O₂ as well as at 1%O₂. Finally we found that HIF-dependent gene expression was abolished in the presence of R59949 suggesting that FIH could also be activated by this agent. Taken together these results reveal R59949 as the first activator of HIF-hydroxylases. This is of particular interest since only inhibitors for these enzymes have been described so far. Therefore this work provides new insights for the development of new cancer therapies designed to target HIF for cancer therapy.



Introduction

The hypoxia inducible transcription factors, are $\alpha\beta$ heterodimers essential for the regulation of oxygen homeostasis. The β subunit (HIF-1 β or Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator, ARNT) and the three different HIF- α subunits identified to date (HIF-1 α , HIF-2 α or HIF-3 α) belong to the basic helix-loop-helix PAS (Per, Arnt, Sim) family of transcription factors. The β subunit is constitutively expressed, while the α subunits are tightly oxygen regulated. In normoxia, HIF- α subunits are very unstable proteins since they interact with the tumor suppressor von Hippel-Lindau (VHL), a component of the E3 ubiquitin ligase complex that leads to the ubiquitination and subsequent proteasome-dependent degradation of HIF- α subunits. VHL interacts with two independent sites of HIF- α subunits that contain the common motif LXXLAP present in both, HIF-1 α and HIF-2 α . In addition, it has been previously demonstrated that hydroxylation of specific proline residues (underlined) of this conserved box are required for the interaction of VHL with HIF. This oxygen-dependent hydroxylation is catalysed by a novel family of mammalian proline hydroxylases named PHD1, PHD2 and PHD3, which belong to the iron (II)-2-oxoglutarate-dependent dioxygenases family. In the absence of oxygen VHL cannot recognize HIF- α subunits and as a consequence, there is concomitant induction of HIF. After HIF migration to the nucleus, it associates with the β subunit and this leads to the subsequent formation of the HIF α/β heterodimers that bind to the DNA specific HRE (Hypoxia Response Elements) of different genes. In addition, the transcriptional activity of HIF is controlled by hydroxylation of an specific asparaginyl residue (Asn 803 in HIF-1 α and Asn 851 in HIF-2 α) localized in the C-terminal transactivation domain. The hydroxylation of the indicated asparaginyl residue by FIH, blocks the association of CH-1 domain of the p300 co-activator and therefore provides a second oxygen-regulated mechanism by which HIF molecules that escape the prolyl-hydroxylation/degradation pathway are impaired to transactivate. Therefore, PHDs and FIH are two different HIF-hydroxylases that have been proposed as the oxygen sensors that control HIF activity.

We have previously shown that pharmacological inhibition of DGK activity with R59949 prevents the hypoxia dependent accumulation of the HIF-1 α subunit as well as its transcriptional activity. In the current work we have analysed the effect of this pharmacological agent at the critical steps of HIFs stabilization and activation pathways.

Our data seem to indicate that the mechanism by which this pharmacological agent inhibits hypoxia-regulated HIF factors implies an activation of the cellular HIF- hydroxylases (PHDs and FIH).

Experimental procedures

Reagents- Antibodies were obtained from the following sources: monoclonal HIF-1 α (Transduction Laboratories), monoclonal and polyclonal HIF-2 α (EPAS) (Novus Biologicals), and monoclonal pVHL (Transduction Laboratories). Horseradish peroxidase-coupled sheep anti-mouse antibody was from Pierce and anti-rabbit horseradish peroxidase antibody was from Amersham Biosciences. DGK inhibitor II (R59949) was purchased from Calbiochem.

Cell Culture and hypoxic conditions- The VHL-deficient 786-O (1-115 or PRC3), RCC10 and UMRC6 cells and their corresponding clones, derived by stable transfection of VHL, 786-O WT10, VHL53 and UMRC 3-4 respectively, as well as Human embryonic kidney cells 293-T, were maintained in RPMI 1640 medium with GLUTAMAX-I (Invitrogen) in the presence of 10% fetal bovine serum. HeLa cells were grown in Dulbecco's minimal essential medium (Biochrom KG, Berlin, Germany) supplemented with 5% fetal bovine serum. Cells were routinely cultured in 95% air and 5% CO₂ (normoxic conditions) at 37°C. To expose cells to hypoxia, they were placed into an airtight chamber with inflow and outflow valves that was infused with a mixture of 1% or 0% O₂, 5% CO₂, 94% N₂ (S.E.Carbueros Metalicos S.A., Madrid, Spain) or placed in an in-vivo 400 hypoxia workstation (Ruskin Technology, West Yorkshire, U.K). In all experiments, cells were plated at 70–90% confluence, and when completely attached, they were exposed to normoxia or hypoxia. In those experiments in which inhibitors were used, these compound were added 1 h before other treatments. In the case of R59949, the experiments were performed in the absence of FCS.

Western Blotting—Proteins from total cell lysates were resolved using 8%-12% polyacrylamide-SDS gel. Proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane (Biorad, CA), blocked with 5% non-fat dry milk in TBS-T (50mM Tris pH 7.6, 150mM NaCl, 0.1% Tween-20) and incubated overnight at 4°C with the indicated antibodies. Immunolabeling was detected by enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey; Supersignal West Femto, Pierce) and visualized with a digital luminescent image analyzer (FUJIFILM LAS-1000 CH).

Quantitative RT-PCR—Immediately after treatments, cells were harvested into 1 ml of Ultra spec reagent (Biotecx; Houston, TX). Total RNA was extracted and quantified, and integrity was tested by gel electrophoresis. 1 µg of total RNA from each sample was retrotranscribed to cDNA (Improm-II reverse transcriptase; Promega). 1–3 µg of cDNA samples were used as template for amplification reactions carried out with the LC FastStart DNA master SYBR Green kit (Roche Applied Science) following the manufacturer's instructions. PCR amplifications were carried out in a Light Cycler System (Roche Applied Science), and data were analyzed with LightCycler software 3 version 3.5.28 (Idaho Technology Inc.). For analysis purposes, the amplicon for each of the analyzed genes was cloned, and known amounts of the cloned product were used to generate a standard curve. The number of copies of the gene of interest in each sample was extrapolated from the corresponding standard curve by the indicated software. For each sample, duplicate determinations were made, and the gene copy number gene expression was normalized by the amount of β-actin. The primer pairs used in this study are reported elsewhere.

U1F-VHL Coimmunoprecipitation

HL immunoprecipitation

Confluent 100mm dishes of 786-O-WT10 cells were once washed with PBS and then collected in 600 µl of IP-lysis buffer (0.5% NP40, 100mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH: 7.6, 5µM MgCl₂, 10mM sodium pirophosphate, 1mM EGTA pH: 8, 1mM orthovanadate, 10mM NaF, 500µM MSF and protease inhibitor cocktail (Roche)) and placed on ice for 10-15 minutes. After

centrifugation (17000 X g for 15 min) supernatants were transferred to fresh tubes and washed with Pansorbin (Calbiochem) to avoid unspecific bindings, precleared for 30 min at 4°C and centrifuged (17000 X g for 10 min). After that, supernatants were incubated with 10µg of IgG1 isotype negative control (antiCD45) coupled to protein G Sepharose beads rolling at 4°C for 1h. Beads were pelleted and supernatants were supplied with 5µg anti-VHL antibody coupled to protein G Sepharose beads and incubated while rolling at 4°C overnight. Beads were collected, washed twice with lysis buffer, once with PBS and stored in PBS at 4°C.

VHL-HIF binding assay

VHL-deficient 786-O (1-115 or PRC3) and RCC10 cells were grown to 90% confluence in 60mm dishes. After 1 hour of pretreatment with different doses of R59949, cells were placed in normoxia or hypoxia workstation (1%O₂) for additional 5 hours. Cells were once washed with PBS and then collected in 300 µl of IP-lysis buffer. In the case of 1% oxygen atmosphere conditions, the lysis was performed inside the workstation chamber to avoid reoxygenation. After removal of cell debris by centrifugation (17000 X g for 15 min), supernatants were transferred to fresh tubes and incubated during 1h at 4°C, with IgG1 isotype negative control beads that has been previously saturated with WT10 lysates. Then, the previously immunoprecipitated pVHL from WT10 cell extract, was added to supernatants and incubated rolling at 4°C overnight. Beads were collected, washed twice with lysis buffer, once with PBS and finally supplemented with 25 µl 2X sample buffer and boiled at 95°C for 5 min. Beads were removed by centrifugation, and supernatants were loaded on 10% SDS-gels. Western analysis was performed using anti HIF-2α, HIF-1α antibodies. AntiVHL antibody was used as immunoprecipitation loading control.

Endogenous PHD assay

After treatments, WT10 and 293-T cells were harvested in phosphate-buffered saline and cell pellet resuspended in 300 µl of hypotonic lysis buffer (20 mM Hepes pH 7.6, 5 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM β-mercaptoethanol, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25 µg/ml aprotinin, 5µg/ml leupeptin). Cell suspension was incubated at 4 °C for 10-

15 min and then forced ten times through a 22G needle. After removal of cell debris by centrifugation, protein concentration was quantified. 10 μ g of previously described recombinant GST-HIF2 (521–542) (Paper Salva JBC) was incubated together with 10 μ g of cell lysate in a final volume of 45 μ l of reaction buffer (20 mM Hepes, pH 7.6, 5 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM β -ME, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 260 μ M $FeCl_2$, 5mM 2-oxoglutarate, 0.6 mM ascorbic acid). Reactions were carried out at normoxia or in a hypoxia workstation at 30°C for 30 min. In the case of 1% oxygen atmosphere conditions (hypoxia) the reaction buffer was previously equilibrated during 2 hours. Sepharose-glutathione GST-HIF complexes were pulled-down (recovered by centrifugation) and resuspended in 200 μ l of binding buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 120 mM NaCl, 10% glycerol, 1.5 mM $MgCl_2$, 5mM KCl, 0.2% Nonidet P-40, 0.5 mg/ml bovine serum albumin), containing 15 μ l of in vitro transcribed-translated (rabbit reticulocyte lysate in vitro coupled transcription/translation from Promega) 35 S]VHL. Samples were incubated at 4 °C for 1 h, protein complexes were recovered by centrifugation, washed twice with binding buffer, and finally resuspended in 30 μ l of 1x loading buffer (2% SDS, 10% glycerol, 10 mM dithiothreitol, 62 mM Tris, pH 6.8, and 0.004% bromophenol blue). Samples were resolved by SDS-PAGE, the gel was stained with Coomassie blue to prove equal GST-HIF loading, fixed (Methanol 10%, Acetic Acid 10% and glycerol 10%) for 30 minutes at R.T, incubated with Amplify, vacuum dried, and exposed to x-ray film.

RESULTS

R59949 specifically inhibits HIF protein accumulation without affecting its mRNA levels

We previously reported that R59949 inhibits the accumulation as well as the transcriptional activity of HIF-1 α in cells exposed to 1% of oxygen concentration. Therefore, we analyzed whether these effects were a consequence of a direct inhibition of its mRNA levels. To this aim, we treated 293-T, 786-O-WT10 and UMRC-3.4 cells with R59949 (30 μ M) and then exposed them to normoxia or hypoxia (1% oxygen) during 6 hours. After that, total cell extracts were obtained and resolved by SDS-PAGE and total RNA was isolated in parallel as detailed under experimental procedures. As it is shown in Figure 1 (*upper panel*), both, 1 α and 2 α HIF protein subunits are induced upon hypoxia stimulation and this stabilization is inhibited in the presence of R59949. HIF-1 α and 2 α mRNA expression was analyzed by quantitative RT-PCR (Q-RT-PCR). In all cell types studied, neither hypoxia, nor R59949 treatment, significantly modified the basal normoxic mRNA levels (Fig 1, *lower panel*). The mRNA levels of the main HIF- α subunit in each cell type (HIF-1 α in the case of 293-T and UMRC 3.4 and HIF-2 α for 786-O-WT10) are shown, even though the same results were obtained when the minority isoform in each cell type was analyzed (*data not shown*). Therefore, from these results we can conclude that cell treatment with R59949, has no effect upon HIFs mRNA levels, but completely abrogates HIFs proteins stabilization after hypoxia exposure.

VHL presence is required for HIF proteins inhibition by R59949.

Once we ruled out a negative effect of R59949 on HIFs mRNA levels, and since HIF protein degradation is regulated by VHL-proteasome pathway, we studied the effect of this specific DGK inhibitor in negative and positive cells for VHL protein. The absence of VHL results in a constitutive accumulation of HIFs factors in normoxia (13 y 36 paper PA), which was not further increased upon exposure to hypoxia, as observed for HIF-1 α isoform (786-O-1-115 cell line) as well as in the case of HIF-2 α (RCC10 cell line) (Fig.2 A and B, *upper panels*). Interestingly, we found that treatment with different doses of R59949 has no effect upon HIF stabilization in the absence of VHL protein, in contrast to the strong dose-dependent inhibition

R59949 stimulates HIF-PHD activity

Once we found that R59949 treatment promotes VHL binding to HIF, we wondered whether this increment in VHL-HIF interaction could be due to an effect upon the hydroxylation state of HIF. Since the recently characterized PHD enzymes are assumed to be responsible of HIF hydroxylation, we decided to study this activity in the presence of R59949. For this purpose, we indirectly assayed PHD activity on lysates from different cell types exposed to hypoxia or maintained in normoxia in the presence or absence of R59949. Because VHL binds to HIF only when the relevant prolines had been hydroxylated by the PHDs, the binding of IVTT [³⁵S]VHL to a HIF-derived construction (VHL capture assay) is considered as an indirect measurement of PHD activity. Recombinant GST-HIF-2 α comprising amino acids 521–542 (including Pro-531 residue, which is homologous to Pro-564 from HIF-1 α) was exposed to lysates from cells under different treatments. After this hydroxylation reaction, the different samples were exposed to [³⁵S]VHL, and the capture of VHL was considered directly proportional to PHDs activity. The assay was performed with lysates from 786-O-WT10 cells treated or not with R59949. As it is shown in Figure 4A, R59949 strongly induced PHD activity upon the untreated basal level when the hydroxylation reaction was made at normal oxygen concentration (21%). The same cell lysates were also assayed under a hypoxic environment (oxygen concentration of 1%), and as expected, we found that PHD activity was reduced relative to the value obtained at 21% O₂. Interestingly, R59949 was able to increase VHL binding to GST-HIF construction even in restricted oxygen supply conditions.

After that, we wanted to analyze whether this effect of the agent was also patent when PHD assay was performed with lysates from cells exposed to hypoxia. Since PHD3 and PHD2 are HIF-dependent genes, we analyzed their mRNA levels in hypoxia to consider amount differences between these lysates and those from normoxia that could affect the PHD activity assay. Because of R59949 specifically abrogates HIF transcription, we also determined the effect of this inhibitor upon the HIF dependent PHD mRNA expression. As it is shown in Fig 4 B, PHD3 and PHD2 mRNA levels are highly induced after hypoxia stimulation in 293-T cells, and this increment is completely abrogated by R59949 treatment. As a control of specificity in

observed in the case of positive cells (Fig.2 A and B, *lower panels*). These results indicate that the presence of VHL protein is required/necessary for inhibition of hypoxia-dependent HIF protein accumulation by R59949 treatment.

R59949 treatment promotes HIF-VHL binding

Based on our observation above mentioned that VHL is required for R59949 inhibition of HIF factors, we thought that one possible mechanism by which R59949 could reduce HIF protein level is by promoting the interaction between HIF and VHL, and therefore, HIF ubiquitination and degradation by the proteasome. To rule out this possibility, we performed HIF-VHL binding assays. Since VHL binding to hydroxylated HIF led to its immediate degradation, we employ a cellular system without functional VHL-proteasome pathway. This model allows us to maintain stabilized the different HIF posttranslational modification. To analyze whether changes upon HIF induced by the different treatments directly affect HIF-VHL binding, we performed coimmunoprecipitation assays, using 786-O-WT10 as VHL source, as detailed under experimental procedures. As it is shown in figure 3, VHL binds to HIF-1 α in RCC10 (A) as well as to HIF-2 α in 786-O-1-115 and 786-O-PRC3 (B and *data not shown*) under normoxic conditions, and this binding is dramatically lost when cells are exposed to hypoxia. In contrast, when cells were previously treated with R59949, this reduction is abolished. These results explain the fact that R59949 completely inhibits HIF protein stabilization by hypoxia, because it would be promoting VHL binding to HIF, and therefore its degradation. Interestingly, the slight increment also observed in VHL-HIF complexes under normoxia in the presence of this compound, could also account for the inhibition exerted by R59949 upon the basal levels of HIF proteins found sometimes under normoxic conditions (see Fig.2 A, B, *upper panels*). In all the experiments, the hypoxia stimulation, as well as the efficiency of inhibition of R59949, was confirmed in VHL-positive cells. These results indicate that R59949 treatment directly increases the ability of VHL to bind to HIF isoforms, targeting HIF factors to proteasome-dependent degradation.

these experiments, we also analyzed the mRNA levels of PHD1, which is HIF independent. In this case neither hypoxia nor R59949 modified mRNA amount. The same results were obtained in 786-O-WT10 cells (data not shown).

The fact that R59949 strongly inhibits PHD3 as well as PHD2 mRNA levels, dissuaded us to perform the activity assay using lysates from hypoxia stimulated cells. Anyway, these results led us to postulate that R59949 is able to induce PHD activity.

In these experiments, we also analyzed the mRNA levels of PHD1, which is HIF independent. In this case neither hypoxia nor R59949 modified mRNA amount. The same results were obtained in 786-O-WT10 cells (data not shown).

These results, together with the previous data here shown, led us to postulate that R59949 is able to induce PHD activity.

R59949 treatment abolishes HIF-dependent transcription in VHL deficient cells

In addition to prolyl hydroxylation by PHDs, HIF is also modified in an asparaginyl residue located in the C-terminal transcriptional activation domain. FIH is the member of (II)-iron-2-oxoglutarate dependent Dioxygenases responsible for this hydroxylation. The binding of the general transcriptional coactivator p300/CBP to HIF is impaired when the asparaginyl residue is hydroxylated by FIH. To further demonstrate the positive role of R59949 upon hydroxylases activity, and since the asparaginyl hydroxylase FIH has been described to require the same cofactors, we investigated the effect of R59949 treatment upon HIF transcriptional activity. For this purpose, we decided to use VHL-deficient cells that, as here described (fig 2), do not show HIF inhibition at the protein level when treated with R59949. Hence the changes observed in HIF-dependent genes in these cells could be attributed to modifications in HIF transcriptional ability and therefore in FIH activity. Since PHD3 has been described as a highly HIF-dependent gene, we monitored the effect of R59949 upon mRNA levels of this gene in 786-O-1-115 cells. As it is shown in Figure 6 (*upper panel*), R59949 significantly abrogated the upregulated levels of PHD3 as well as PHD2 mRNA observed in this VHL-negative cell line. In contrast, PHD1 mRNA levels, which do not depend on HIF, are not affected by R59949 treatment in the same sample (Fig. 6 *lower panel*).

All together these results suggest that R59949 stimulates HIF-hydroxylase activities and this explain its inhibitory effect previously observed upon both, HIF accumulation as well as transcriptional induction. Our results are promising since only HIF-hydroxylases inhibitors have been described to the date, and this is, to our knowledge, the first time that a HIF-hydroxylases activator is proposed.

DISCUSSION

We have previously reported that the DGK inhibitor R59949 significantly inhibits HIF-1 α protein (paper Jul). Here we show that this agent is also able to inhibit HIF-2 α isoform. In the present work, we aimed to determine what elements of hypoxia response pathway were affected by this compound. First of all we have ruled out a possible role of R59949 upon HIFs mRNA levels. The slight changes observed in some cases do not account for the strong inhibition observed at the protein level. After that, we have determined that R59949 requires VHL presence to exert its negative effect upon HIFs. In these experiments the convenient uptake and inhibition ability of R59949 was controlled confirming that the agent abolishes PA accumulation induced by hypoxia in these cells (data not shown). In addition, we have characterized how R59949 abrogates HIFs activation by hypoxia, showing that this agent leads to both, HIFs-VHL binding as well as HIF hydroxylases activity stimulation. The increment in HIFs-VHL binding and PHD activity also found after R59949 treatment in normoxic conditions, could account for the inhibition of the basal HIFs protein level sometimes observed at 21%O₂ concentration. Therefore, R59959 stimulates PHDs activity, promoting the recognition of the hydroxylated HIF by VHL. Finally, we have found that R59949 abolishes HIF-dependent genes, which are upregulated in VHL deficient cells. The fact that this compound is able to inhibit HIFs transcriptional activity without affecting HIFs protein stabilization (Fig 2), suggest that R59949 is also regulating FIH activity in these VHL negative cells. However, further experiments need to be done in order to clarify the effect of R59949 upon FIH activity.

Once determined the positive role of R59949 upon HIF-hydroxylases activity, it would be necessary to perform further experiments to better define the direct target of R59949. On one hand, as molecular oxygen is one of the substrates of these enzymes, one possibility could be that R59949 is raising the oxygen affinity of HIF-hydroxylases. Under low oxygen tension (1% O₂), when the activity of these enzymes is quite reduced, this agent could be enhancing their ability to bind molecular oxygen and therefore increasing hydroxylation and degradation rate of HIF. By the other hand, it has been recently described that respiratory inhibitors and nitric oxide might redistribute intracellular O₂, thus increasing its availability for prolyl hydroxylases (Moncada). In this sense, R59949 could also regulate HIF-hydroxylases through this mechanism. As hydroxylation reaction required different cofactors in addition to molecular oxygen, another possibility could be that R59949 has an effect upon them. In this regard, it has been reported that the inhibition of HIF-hydroxylases by transition metals like nickel and cobalt, is due to depletion of intracellular ascorbate levels (JBC Salnikow). It has been determined that under normal tissue culture conditions ascorbate and iron levels are enough to permit HIF-hydroxylases activity but under certain stimuli that promotes cellular proliferation (growth factors, oncogenical transformation...) these cofactors became limitant and therefore enzyme activity is reduced and HIF is accumulated. In these conditions, supplementation with iron or ascorbic restores enzyme activity and therefore, we wonder whether R59949 could regulate ascorbate or iron intracellular pools as well as their uptake. Finally, in a recent report it has been proposed the role of reactive oxygen species (ROS) in *jun D* ^{-/-} cells upon HIF-hydroxylases activity by promoting oxidation of Fe(II) into Fe(III), and therefore increasing the proportion of inactive PHD in Fe(III) oxidation state. According to these data, we do not exclude the possibility that R59949 could affect ROS levels, and this could account for its positive effect upon HIF-hydroxylases. Nevertheless, more experiments should be done to further understand the implications of the regulation of these cofactors upon HIF-hydroxylase activity and the role of R59949 upon them.

We have previously described that hypoxia induces an increment of phosphatidic acid level parallel to HIF protein accumulation. Both, PA accumulation as well as HIF activation induced

by hypoxia are abrogated after R59949 treatment. This compound has been characterized as a specific inhibitor of type I Diacylglycerol kinases (DGK) and therefore we have proposed a possible role of these enzymes in the regulation of HIF after hypoxia exposure. In the current work, we have proposed R59949 as a novel activator of HIF-hydroxylases activity. When we performed the same experiments using the previously described SMS/PC-PLC inhibitor, D609 (Ref), we found that this agent also induces VHL-HIF complexes formation (data not shown). Considering that D609 also decrease the hypoxia-induced PA, all this data suggest a possible role for hypoxia-induced PA in the regulation of VHL-HIF interaction. In this sense, PA accumulation after hypoxia exposure would be inhibiting HIF-hydroxylases activity, contributing to HIF activation. Since PA is a lipid second messenger which is induced in response to different stimuli, the possible regulation of HIF-hydroxylases by PA could be an interest field of investigation when HIF is induced by other stimuli than hypoxia such as growth factors, cytokine stimulation...However from the results obtained in the present work we can not exclude a direct effect of R59949 upon HIF-hydroxylases regardless hypoxia-induced PA pathway and therefore further experiments will be performed to clarify this point.

In the last few years, HIF-1 α and HIF-2 α have been implicated as critical factors in tumor progression as well as in pathological angiogenesis. HIF expression promotes the survival of the cells in the hypoxic-microenvironment of tumors increasing the expression of proteins that regulate metabolic adaptation (GLUT-1, LDH), apoptosis resistance (NOS-2, TGF- α), angiogenesis (VEGF, TGF- β 3, VEGFR2) and invasion and metastasis (c-MET, UPAR). In addition, hypoxic cancer cells are more likely to be resistant to radiation and chemotherapy and therefore, HIF inhibition would be a therapeutically approach against these situations. Since PHDs and FIH are responsible for the regulation of HIF, novel anti-HIF therapies are also focused to regulate these hydroxylases activity. In this regard, our results indicating a stimulatory effect of R59949 upon these enzymes, raise/bring up the possible use of this inhibitor as cancer therapeutic agent. One of the advantages of this compound is that it is able to inhibit with the same efficiency HIF-1 α as well as HIF-2 α stabilization, and therefore offer the

possibility of using it in many different cell types. In addition/By the other hand, this compound seems to stimulate PHD as well as FIH activity and therefore could regulate HIF stabilization as well as its transcriptional activity. This could have critical importance in the case of VHL deficient tumors, where HIF molecules escape the prolyl-hydroxylation/degradation pathway, and therefore the only approach to control hypoxia adaptation of these tumor cells would be the inhibition of HIF-transcriptional activity. Since we have observed that R59949 abrogates HIF-dependent transcription in 786-O-1-115 cells (Fig 5), it could be propose the use of this inhibitor for the treatment of these kind of highly aggressive tumors. Even more, R59949 could also be used in the treatment of diabetic retinopathy or pulmonary hypertension, pathologies where HIF up-regulation is also involved. Nevertheless, *in vivo* experiments might be needed to validate the design of R59949-related therapies for its possible clinical appliance.

In conclusion our data open a new area of investigation around HIF-hydroxylases activation, that together with the recent knowledge about PHD inhibition, clarify the mechanism of regulation of these enzymes. The characterization of HIF-hydroxylases functioning could be of great interest not only in hypoxia-induced HIF but also in other processes in which HIF has been involved such as inflammation, growth factors response, etc. Even more, this information could be useful in case new targets of HIF-hydroxylases were identified in future.

Figure Legends

Figure 1. R59949 inhibits HIFs proteins but not their mRNA levels. 293-T, UMRC 3.4 and 786-O-WT10 were pretreated for 1 h with R59949 (+) (30 μ M), or vehicle (-) (Me₂ SO) an then exposed to hypoxia (Hx, 1%O₂) or left in normoxia (N, 21%O₂) during 5-6 h. After that, HIF- α and HIF-2 α protein level was determined by Western blot. As a loading control, the membranes were probed with an anti α -tubulin protein antibody. Here we show one representative experiment (*upper panel*). In parallel, the abundance of each HIFs mRNA was

determined by Q-RT-PCR as indicated under "Experimental Procedures". HIF-1 α and HIF-2 α amount was normalized by the content of β -actin in each case. The absolute values obtained in three independent experiments performed in duplicated and their average are shown.

Figure 2. The inhibition of HIF accumulation by R59949 is not observed in VHL-negative cells. 786-O (A) and RCC (B) cells were grown to 90% of confluence in p6 multiwell plates. Cells were pretreated with doses of R59949 from 10 μ M to 40 μ M as indicated, and then exposed to hypoxia (Hx, 1%, O₂) or left in normoxia (N, 21%O₂) during 5 h. After that, total cell extracts were obtained and resolved by SDS-PAGE. To analyze the content of HIFs protein levels, western blot was performed using specific antibodies. As a loading control, α -tubulin (A) or Sp1 (B) were also probed in the same membranes. These results were obtained in four additional experiments. A representative one is here shown.

Figure 3. HIF-VHL interaction is enhanced upon R59949 treatment. VHL-deficient cell RCC10 (A) and 786-O-1-115 (B) were exposed to hypoxia (Hx, 1% O₂) or kept in normoxia (N, 21%O₂) during 5 h in the presence of R59949 (+) (30 μ M) or vehicle (-) (Me₂ SO). After that, cell extracts were obtained in IP-lysis buffer (Experimental Procedures) and supplied with the same amount of 786-O-WT8-VHL immunopurified protein. The VHL-HIF complexes were then coimmunoprecipitated, resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blot. The level of HIF-1 α (A) and HIF-2 α (B) bound to VHL were detected by immunoblot. As an immunoprecipitation loading control the membranes were also probed with an anti-VHL protein antibody. A representative experiment from four performed is shown for each cell type.

Figure 4. PHD activity is stimulated by R59949 treatment. (A) Lysates from 786-O-WT cells maintained in normoxia (N) and treated with 30 μ M of R59949 (+) or vehicle (-) (Me₂ SO) during 5 h, were used to determine PHD activity by an VHL capture assay as indicated under Experimental Procedures. The same amount of lysates was assayed in parallel at both 21% as well as 1% O₂ concentration. The amount of S³⁵VHL captured by GST-HIF exposed to lysis buffer was subtracted from the rest of samples. We assigned the value of 1 to the PHD activity level obtained when untreated normoxic lysates were assayed at 21% O₂ concentration.

and the rest of samples were normalized to this value. To control linear conditions in these assays, GST-HIF was exposed to double concentration of control cell lysate, observing that [³⁵S]VHL was recovered about twice in this case (*data not shown*). Here we show one representative experiment from additional four.

(B) 293-T cells were grown to 90% of confluence in p100 plates. Cells were pretreated with 30 μ M of R59949 (+) or vehicle (-) (Me₂ SO), and then exposed to hypoxia (Hx, 1%, O₂) or left in normoxia (N, 21%O₂) during 5 h. The PHDs mRNA level from these cells, was determined by Q-RT-PCR as indicated under "Experimental Procedures". PHDs amount was normalized by the content of β -actin in each case. Here we show one experiment performed in duplicate.

Figure 5. HIF transcriptional activity is blocked after R59949 treatment of VHL negative cells. 786-O-1-115 VHL deficient cells were cultured to 90% confluence in p60 dishes. Cells were pretreated with 30 μ M of R59949(+) or vehicle (-) (Me₂ SO), and then exposed to hypoxia (Hx, 1%, O₂) or left in normoxia (N, 21%O₂) during 5 h. Total mRNA was extracted and the amount of PHD3 mRNA (*upper panels*) or PHD2 mRNA levels (*lower panels*) in the different treatments were determined by Q-RT-PCR. The values obtained were normalized by the content of β -actin in each case. We assigned the value of 1 to the normoxia untreated level and the other samples were normalized to this value. Here we show the average of two independent experiments performed in duplicate.

Fig.1

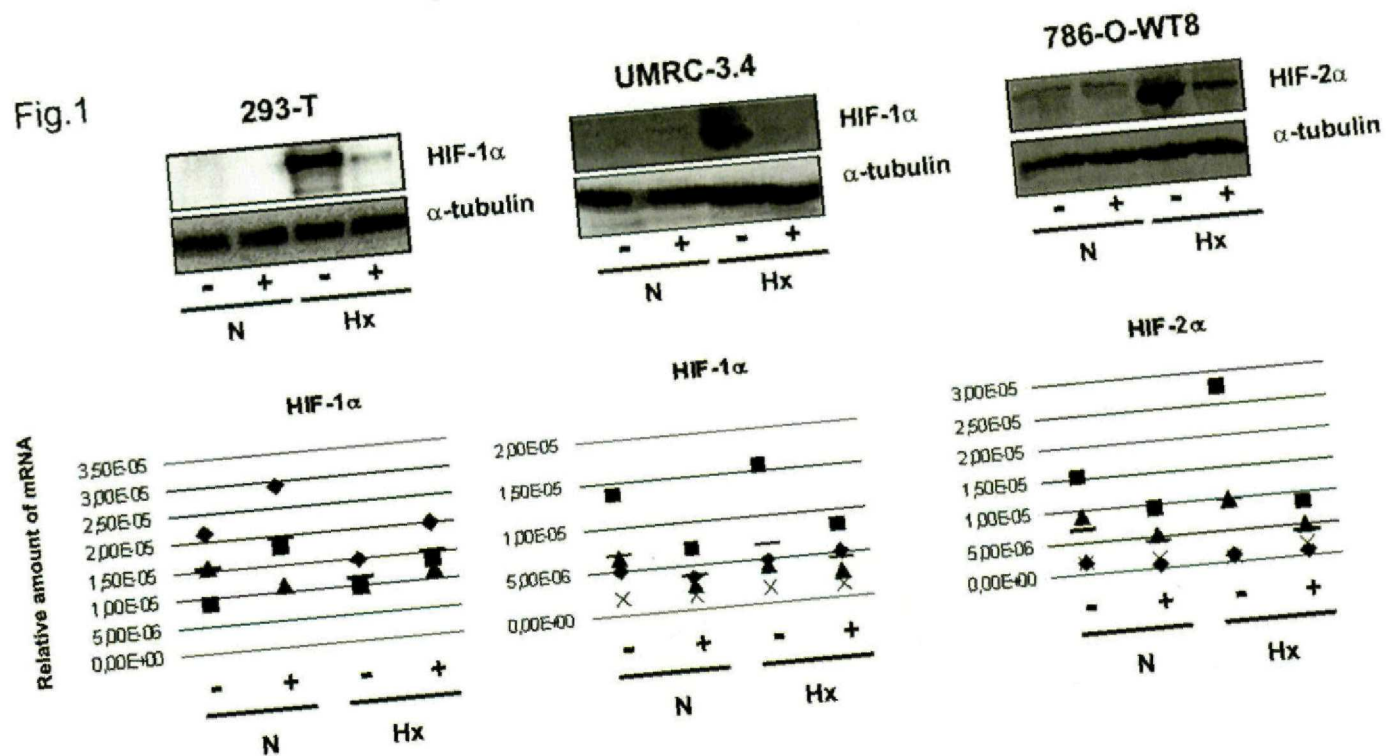
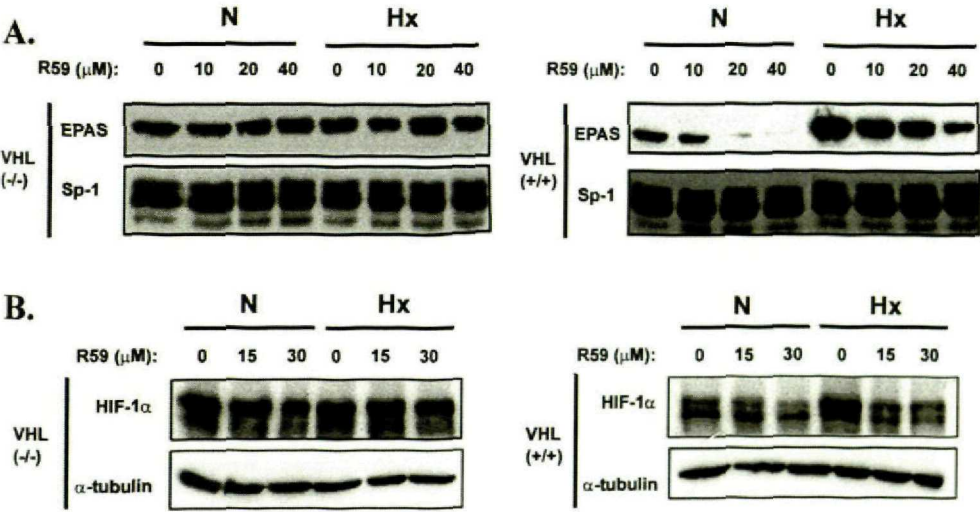


Fig.2



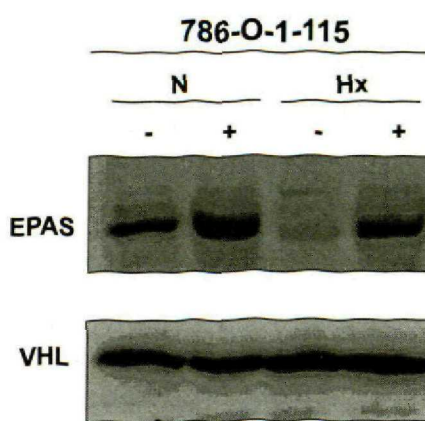
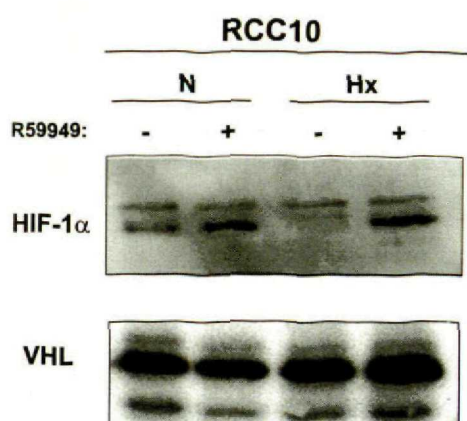
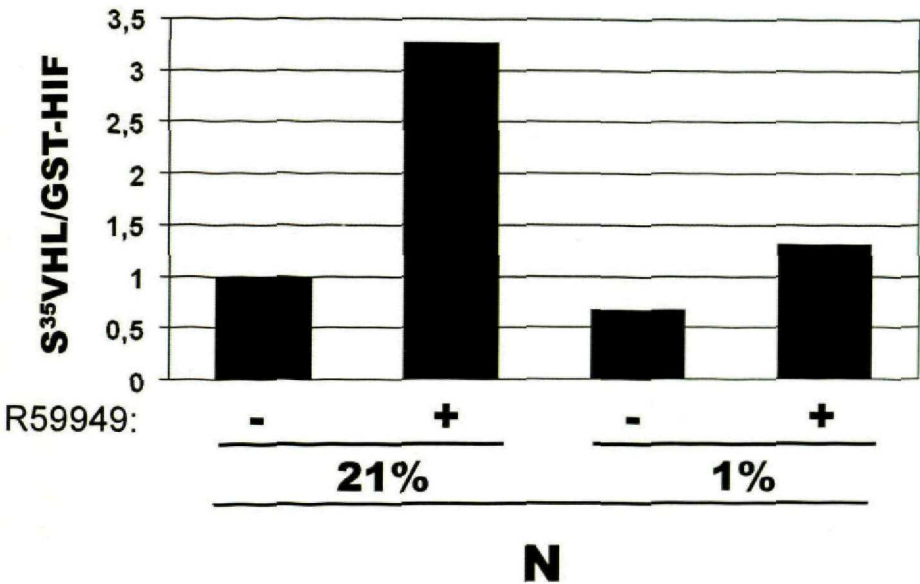


Fig.4

A

786-O-WT10



B

293-T

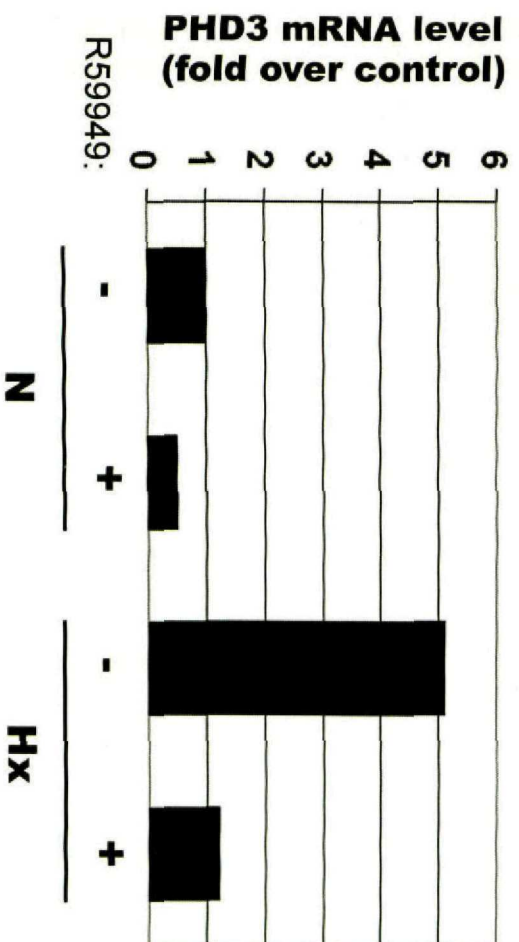


Fig.5

786-O-1-115

